

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR PROFESSOR DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DER FETTKOMPONENTE AUF DIE INFLAMMATION UND
METABOLISCHE VERÄNDERUNGEN IN EINEM DIÄTETISCHEN TIERMODELL
DER NICHT-ALKOHOLISCHEN STEATOHEPATITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Ascher

2012

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTOR PROFESSOR DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DER FETTKOMPONENTE AUF DIE INFLAMMATION UND
METABOLISCHE VERÄNDERUNGEN IN EINEM DIÄTETISCHEN TIERMODELL
DER NICHT-ALKOHOLISCHEN STEATOHEPATITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Ascher

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Roland Büttner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Martin Loss
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Mai 2013

"Die Leber wächst mit ihren Aufgaben." – *Dr. med. Eckhard von Hirschhausen*

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	5
2. Einleitung	8
2.1 Adipositas als Statussymbol zur Zeit des Wirtschaftswunders	8
2.2 Adipositas als Volkskrankheit der Industrienationen im 20. und 21. Jahrhundert.....	11
2.3 Adipositas als Bestandteil des metabolischen Syndroms.....	12
2.4 Die nicht-alkoholische Fettleber als Teil des metabolischen Syndroms.....	16
2.4.1 Epidemiologie.....	16
2.4.2 Nicht-alkoholische Steatose (NAFLD).....	17
2.4.3 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)	18
2.4.4 Diagnostik von NAFLD und NASH.....	19
2.4.5 Prognose von NAFLD und NASH	20
2.5 Ätiopathogenese des metabolischen Syndroms inklusive der nicht-alkoholischen Fettleber	21
2.6 Hochfettdiäten.....	26
2.6.1 Allgemeines.....	26
2.6.2 Wirkung von Hochfettdiäten auf den Metabolismus	26
2.6.3 Design von Hochfettdiäten.....	27
3. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung	29
4. Material und Methodik	31
4.1 Versuchstiere.....	31
4.2 Tierdiäten.....	31
4.2.1 Original AD	32
4.2.2 AD mit Olivenöl.....	32
4.2.3 AD ohne Cholesterol	32
4.2.4 AD ohne Cholat	33
4.2.5 AD ohne Cholin	33
4.2.6 AD mit Kokosfett.....	33
4.2.7 Standarddiät	33
4.2.8 Vergleich der Diäten	34
4.3 Material.....	42
4.3.1 Allgemeine Laborausrüstung	42
4.3.2 Geräte	43
4.3.3 Chemikalien.....	44
4.3.4 ELISA-Assay Kits	45

4.3.5 Verwendete Kits für die mRNA-Expressionsanalyse.....	46
4.3 Hard- und Software.....	48
4.4 Studienbeschreibung	48
4.5 Methoden.....	50
4.5.1 Gewichtskontrollen	50
4.5.2 Blutzuckermessung	50
4.5.3 Mouse/Rat Adiponectin ELISA Kit	50
4.5.3.1 Prinzip.....	50
4.5.3.2 Durchführung	51
4.5.4 Rat Insulin ELISA – Enzymimmunoassay	52
4.5.4.1 Prinzip.....	52
4.5.4.2 Durchführung	52
4.5.5 Enzymimmunoassay für quantitative Bestimmung von Maus- und Ratten-Leptin	53
4.5.5.1 Prinzip.....	53
4.5.5.2 Durchführung	53
4.5.6 Triglyzeridbestimmung aus Lebergewebe und Rattenplasma	54
4.5.6.1 Prinzip.....	54
4.5.6.2 Durchführung	54
4.5.7 Anfertigung der Leberschnitte für das histologische Scoring.....	55
4.5.8 mRNA Expressionsanaylse von TNF α und Kollagen Typ I α 1	57
4.5.8.1 RNA Isolierung.....	57
4.5.8.2 RNA-Konzentrationsmessung	58
4.5.8.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-chain-Reaktion	58
4.5.8.4 Primertest	59
4.5.8.5 Sequenzierung.....	60
4.5.8.6 LightCycler®	60
4.6 Angaben zur Statistik	61
5. Ergebnisse	62
5.1 Gewicht.....	62
5.1.1 Gewichtsverlauf und erreichtes Endgewicht	62
5.1.2 Futterverbrauch	68
5.2 Glukosestoffwechsel	70
5.2.1 Blutzuckerprofil	70
5.2.2 Insulinspiegel.....	72
5.2.3 HOMA-Index.....	74
5.3 Adiponektin	76

5.4 Leptin	78
5.5 Triglyzeride	80
5.5.1 Hypertriglyzeridämie	80
5.5.2 Hepatische Steatose	82
5.6 Histopathologisches Scoring der Leberschnitte	84
5.7 mRNA-Expressionsprofil	92
5.7.1 Tumornekrose Faktor-alpha (TNF- α)	92
5.7.2 Kollagen Typ I alpha 1	94
6. Diskussion	96
6.1 Stand der Forschung	96
6.2 Vergleich unterschiedlicher Diätregimes mit den Diäten dieser Studie	97
6.3 Diätetisches Cholesterin begünstigt hepatische Entzündung	98
6.4 Einfluss der Fettsäurekomposition einer atherogenen Diät auf die NASH	99
6.4.2 Olivenöl als Fettbasis	101
6.4.2.1 Wirkung von Olivenöl auf den Metabolismus	101
6.4.2.2 Einfluss von Olivenöl auf die Inflamationsreaktion der NASH	103
6.4.2.3 Diätetisches Olivenöl führt zu abgemilderter hepatischer Inflammation ohne Besserung von Insulinresistenz und Steatose	104
6.5 Insulinresistenz und Hypoadiponektämie führen nicht unbedingt zu hepatischer Inflammation	105
6.6 Resümee und Ausblick	105
6.6.1 Resümee	105
6.6.2 Ausblick	106
7. Zusammenfassung	108
8. Dank	111
9. Literaturverzeichnis	112

1. Abkürzungsverzeichnis

AACE:	American Association of Clinical Endocrinologists
ACTH:	Adrenokortikotropes Hormon
AD:	Atherogene Diät nach Paigen
AdipoR1 / 2:	Adipokin Rezeptor 1 / 2
AFLD:	alcoholic fatty liver disease
AHA:	American Heart Association
ASH:	alcoholic steatohepatitis
ATP:	Adenosintriphosphat
ATP III:	Adult Treatment Panel III
BGS 98:	Bundesgesundheitssurvey
BMI:	Body Mass Index
cDNA:	korrespondierende DNA
CO ₂ :	Kohlenstoffdioxid
CRH:	Corticotropin Releasing Hormone
CRP:	C - reaktives Protein
CT:	Computertomographie
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EKG:	Elektrokardiogramm
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
FFA:	free fatty acids
γ - GT:	gamma Glutamyltransferase
GE:	Bruttoenergie

GH:	Somatotropin
GLUT-4:	Glucose Transporter 4
GOT:	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (= ASAT: Aspart-Aminotransferase)
GPT:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (= ALAT: Alanin-Aminotransferase)
HDL:	high density lipoprotein
HF-Diät:	Hochfettdiät
HRP:	Horseraddish peroxidase
ICAM:	Intercellular adhesion molecules
IDF:	International Diabetes Federation
IL-1/-6/-8/-10:	Interleukin 1 / 6 / 8 / 10
INF- γ :	Interferon gamma
IRS-1/-2:	Insulin Rezeptor Substrat 1 / 2
LDL:	low density lipoprotein
ME:	metabolisierbare Energie
MRT:	Magnetresonanztomographie
MUFA:	monounsaturated fatty acids
MW:	Mittelwert
NAFLD:	non(-)alcoholic fatty liver disease
NASH:	non(-)alcoholic steatohepatitis
NCEP:	National Cholesterol Eduaction Programm
NF- κ B:	nuclear factor κ B
NHLBI:	National Lung, Heart and Blood Institute
NVS II:	Nationale Verzehrstudie II
ω -3/-6/-9 PUFA:	Omega -3/-6/-9-mehrfach ungesättigte Fettsäuren

PAI-1:	Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
POD:	Peroxidase
PPAR α / γ / δ :	peroxisom proliferator- activated receptor alpha / beta / gamma
PUFA:	polyunsaturated acids
RNA:	Ribonukleinsäure
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD:	Standardabweichung
SFA:	saturated fatty acids
TGF- β :	Transforming growth factor beta
TMB:	Tetramethylbenzidin
TNF- α :	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNFR1:	TNF- α Rezeptor 1
TRH:	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH:	Thyreotropin
UCP 2:	uncoupling protein 2
VCAM:	vascular cell adhesion molecule
VLDL:	very low density lipoprotein
WHO:	World Health Organization
WHR:	Waist-to-Hip-Ratio

2. Einleitung

2.1 Adipositas als Statussymbol zur Zeit des Wirtschaftswunders

Aufgrund der rapiden Veränderung der Gesellschaft im Laufe des 20. Jahrhunderts hat sich vor allem in den westlichen Industrienationen eine Kultur des Wohlstandes und des Überflusses entwickelt. Besonders eindrücklich ist die Situation des zerstörten Deutschlands der Nachkriegsjahre, welches sich im Laufe der 1950er Jahre mit Hilfe von Marshallplan, Währungsreform und Leistungsbereitschaft seiner Bürger zu einer der führenden Industrienationen erhob¹. In den langen Jahren des Hungers und der Unterversorgung mit Lebensmitteln, die nur mangelhaft durch Lebensmittelkarten und Bezugsscheine verteilt wurden, berechneten die Siegermächte noch den Kalorienbedarf eines ausgewachsenen Mannes auf das Minimum von 1400 kcal pro Tag. Doch auch die Unterschreitung dieser Grenze gehörte zum täglichen Leben. In den ersten Nachkriegsjahren herrschte großer Hunger und eine Mahlzeit konnte oft nur über den Schwarzmarkt oder über Ersatzmittel beschafft werden. Mit dem Aufschwung in Deutschland erhielten auch die Menschen eine reichhaltigere Ernährung. „Wir sind wieder Wer“; dies schlägt sich neben der erweiterten Produktpalette der Läden auch in den Ausgaben der Deutschen nieder. Vierköpfige Familien investierten nach Aussagen des Statistischen Bundesamtes 46% des Nettoeinkommens in Nahrungsmittel. Besonders beliebt waren Fleischprodukte und amerikanische Waren, da die Menschen lange auf diese verzichten mussten und noch ein hohes Nachholbedürfnis hatten. Aus einer ausreichenden Versorgung mit Nahrungsmitteln heraus entwickelte sich eine Überversorgung, die in eine regelrechte Fresswelle ausartete, wie zeitgenössische Bilder aus Kochbüchern zeigen (siehe Abb. 1 bis 3). Der Wohlstandsbauch galt als Statussymbol und fettreiche Nahrung als besonders hochwertig. Zeitungen aus dem Jahre 1952 berichten erstmals darüber, dass viele Bundesbürger ein Gewichtsproblem hatten¹.



Abbildung 1:

*Illustration eines Kochbuchs zur Zeit des Wirtschaftswunders
(Quelle: www.wirtschaftswundermuseum.de)*



Abbildung 2:

*Illustration eines Kochbuchs zur Zeit des Wirtschaftswunders
(Quelle: www.wirtschaftswundermuseum.de)*



Abbildung 3:

Illustration eines Kochbuchs zur Zeit des Wirtschaftswunders
 (Quelle: www.wirtschaftswundermuseum.de)

2.2 Adipositas als Volkskrankheit der Industrienationen im 20. und 21. Jahrhundert

Während in der Zeit des Wirtschaftswunders Adipositas noch als Zeichen des Wohlstandes galt, ist diese metabolische Erkrankung heute, wie die sogenannte Nationale Verzehrsstudie II² im Jahr 2008 herausgefunden hatte, überwiegend ein Problem der sozial schwachen Schichten in der Bundesrepublik Deutschland. Laut der NVS II war 2008 jeder fünfte Bundesbürger fettleibig, das heißt, er hatte einen Body Mass Index über 30 kg/m². Bei den Jugendlichen (14 bis 17 Jahren) waren immerhin 7-11% adipös. Im Altersbereich von den 18- bis 19-jährigen lag der Anteil bei den Männern bereits bei 14% und bei den Frauen bei 9,4%. Mit zunehmendem Alter nahm auch die Anzahl der fettleibigen Studienteilnehmer massiv zu, so dass 30% der über 60-jährigen Personen einen BMI über 30 kg/m² hatten. Insgesamt waren 66% der männlichen und 51% der weiblichen Deutschen im Alter zwischen 18 bis 80 Jahren mit einem BMI von über 25 kg/m² übergewichtig². Zudem zeigte die NVS II, dass die Anzahl der adipösen und übergewichtigen Bundesbürger im Zehnjahresvergleich seit dem Bundesgesundheitsurvey 1998 (BGS 98)^{2,3} zugenommen hatte. Neben dem BMI zog die NVS II auch die Waist-Hip-Ratio als Maß heran. Bei den jungen Erwachsenen hatten 0,2% der Männer und 3,1% der Frauen eine pathologische WHR. Diese Werte stiegen im Alter stetig an, so dass bei den 70- bis 80-jährigen die Männer 37,5% und Frauen 49,8% eine erhöhte WHR aufwiesen. Ein weiteres Kriterium stellte der Taillenumfang dar, der bei Männern über 94 cm als „erhöht“ und über 102 cm als „deutlich erhöht“ gilt. Bei Frauen sind die Grenzen über 80 cm und über 88 cm. Junge Erwachsene hatten etwa zu 15% einen erhöhten Taillenumfang, während 70- bis 80-jährige Studienteilnehmer zu etwa 80% dieses Kriterium erreichten. Alle diese Messkriterien zeigen, dass im Alter die Wahrscheinlichkeit für Übergewicht und damit das Risiko für metabolische Erkrankungen deutlich zunimmt². Wie oben erwähnt, stellte die NVS II darüber hinaus fest, dass Adipositas vor allem ein Problem der sozial benachteiligten Schichten ist. Der Schichtindex wurde dabei als Punktesystem von Bildungsstand, Finanzkraft des Haushalts und beruflicher Stellung des Hauptverdieners der Familie festgelegt. So sind laut der Ergebnisse dieser Studie ein hoher Schulabschluss und ein höheres Pro-Kopf-Nettoeinkommen ein protektiver Faktor für Adipositas. Zum einen mag dies daran liegen, dass ein höherer Bildungsstand mit mehr Wissen über eine gesunde und ausgewogene Ernährung verbunden ist. Zum anderen bieten größere finanzielle Mittel auch einen größeren Spielraum beim Einkauf. So griffen laut NVS II 60% der Frauen und 47% der Männer mit hohem Schulabschluss und einem Nettoeinkommen über 4000 € pro Monat zu Bioprodukten, wohingegen in einer Einkommensklasse unter 1500 € im Monat nur 37% Frauen und 24% Männer die teureren, aber wahrscheinlich gesünderen Produkte kauften.

Auch der Familienstatus ist ein Faktor für Übergewicht. So waren laut NVS II ledige Männer und Frauen seltener übergewichtig, als verheiratete, verwitwete oder geschiedene².

2.3 Adipostas als Bestandteil des metabolischen Syndroms

Adipositas ist die Volkskrankheit der Gegenwart und birgt neben dem kosmetischen Aspekt auch noch vielfältige gesundheitliche Gefahren. 1988 wurden von G. M. Reaven einige Risikofaktoren, v.a. Dyslipidämie, Hypertonie und Hyperglykämie zu einem Krankheitsbild zusammengefasst, welches er als „Syndrome X“ bezeichnete, wobei seiner Ansicht nach die Insulinresistenz als dessen Hauptursache fungiert^{4,5}. Der Bericht Adult Treatment Panel III des National Cholesterol Education Program benutzt eher den Term des Metabolischen Syndroms für diese Sammlung von metabolischen Erkrankungen und identifiziert diese als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen^{5,6}. Neben den bereits erwähnten Begriffen werden „Das tödliches Quartett“, „Reavensyndrom“ oder „Wohlstandssyndrom“ als Synonyme für diese Erkrankung gebraucht⁷. In der Literatur und dem klinischen Alltag hat sich die Bezeichnung „metabolisches Syndrom“ durchgesetzt. Zur Normierung und genaueren Festlegung der Bestandteile dieser neuen Volkskrankheit wurden mittlerweile weltweit fünf verschiedene Ansätze für die Kriterien der klinischen Diagnosestellung aufgestellt, die im Folgenden erläutert werden⁵. Dennoch existiert bisher keine gültige ICD-10 Kodierung.

Im Jahre 1997 erarbeitete eine Beratungsgruppe der World Health Organization (WHO) eine Arbeitsdefinition des metabolischen Syndroms im Rahmen einer Übersichtsklassifikation des Diabetes mellitus Typ II^{5,8}. Dieser Bericht wurde 1999 verfeinert und auf der Webseite der WHO veröffentlicht⁵. Um die klinische Diagnose des metabolischen Syndroms zu stellen, müssen laut WHO neben einer Insulinresistenz noch zwei zusätzliche metabolische Symptome (vgl. Tabelle 1) nachgewiesen werden. Per Definition liegt eine Insulinresistenz vor beim manifesten Diabetes mellitus Typ II, bei gestörter Glukosetoleranz oder falls bei dem Patienten pathologische Nüchtern-Blutzuckerwerte oder bei normalen Nüchtern-Glukosewerten (< 110 mg/dl) eine Glukoseaufnahme unter der untersten Quartile der Heimatbevölkerung unter Beobachtung von hyperinsulinämischen und euglykämischen Bedingungen gemessen wird^{5,8}.

Tabelle 1

WHO-Kriterien zur Diagnostizierung des metabolischen Syndroms: Neben der Insulinresistenz müssen zwei weitere metabolische Symptome vorliegen

Symptom	Pathologisches Kriterium
antihypertensive Therapie und/oder hohe Blutdruckwerte	systolisch > 140 mmHg oder diastolisch > 90 mmHg
Plasma Triglyzeride	≥ 150 mg/dl (≥ 1,7 mmol/l)
Erniedrigtes HDL-Cholesterol:	Männern: < 35 mg/dl (< 0,9 mmol/l) Frauen: < 39 mg/dl (< 1,0 mmol/l)
Adipositas	BMI >30 kg/m ² WHR > 0,9 bei Männern und > 0,85 bei Frauen
Albuminausscheidung im Urin oder Albumin-Kreatinin-Clearence	≥ 20 µg/min ≥ 30 mg/g

Zur Diagnose eines metabolischen Syndroms müssen dagegen laut ATP III – Kriterien (vgl. Tabelle 2) drei von insgesamt fünf metabolischen Symptomen erfüllt werden. Diese Einteilung distanziert sich von der Ansicht, dass die Insulinresistenz unabdingbar für die Entstehung des metabolischen Syndroms sei⁵.

Tabelle 2

Diagnosekriterien nach ATP III: Zur Diagnosestellung müssen drei der fünf Symptome zutreffen.

Symptom	Pathologisches Kriterium
Abdominelle Adipositas (Bauchumfang)	Männer: > 102 cm Frauen: > 88 cm
Triglyzeride	≥ 150mg/dl
HDL-Cholesterol	Männer: < 40 mg/dl Frauen: < 50 mg/dl
Blutdruck	systolisch ≥ 130 mmHg oder diastolisch ≥ 85 mmHg
Nüchtern-Blutzucker	≥ 110 mg/dl

Ein drittes Set an klinischen Diagnosekriterien liefert die American Association of Clinical Endocrinologists^{5,9}, das ein Hybrid der ATP III- und WHO-Kriterien zu sein scheint. Es obliegt dem Ermessen des behandelnden Arztes, die Anzahl der zutreffenden Symptome festzulegen, welche für die Diagnose des Insulin Resistance Syndroms, ein weiteres Synonym des metabolischen Syndroms, notwendig sind. Die Autoren differenzieren jedoch sogenannte Hauptfaktoren (vgl. Tabelle 3) von anderen Risikofaktoren. Zu den Risikofaktoren zählen neben einer positiven Familienanamnese hinsichtlich Diabetes mellitus Typ II, kardiovaskulären Erkrankungen oder arteriellen Hypertonus sowie Polyzystisches Ovar Syndrom auch ein sitzender Lebensstil, fortgeschrittenes Alter und die Zugehörigkeit zu ethnischen

Gruppen mit erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ II bzw. kardiovaskulären Erkrankungen^{5,9}.

Tabelle 3

Hauptfaktoren der AACE Kriterien zur Diagnosestellung des metabolischen Syndrom: Beurteilung durch den Arzt wird vorausgesetzt.

Symptom	Pathologisches Kriterium
Übergewicht/Adipositas	BMI ≥ 25 kg/m ²
Erhöhte Triglyzeride	≥ 150 mg/dl (1,69 mmol/l)
Niedriges HDL-Cholesterol	Männer: < 40 mg/dl (1,04 mmol/l) Frauen: < 50 mg/dl (1,29 mmol/l)
Hypertonie	systolisch ≥ 130 mmHg diastolisch ≥ 85 mmHg
2h Postglucose Challenge	≥ 140 mg/dl
Nüchtern Blutzucker	110-126 mg/dl

Im Jahr 2005 fanden heftige Diskussionen über das metabolische Syndrom statt, die von der Definition der International Diabetes Federation ausgelöst wurden. Die finale Fassung dieser Kriterien wurden als „IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome“ im darauffolgendem Jahr veröffentlicht. Demnach leidet ein Patient unter einem metabolischen Syndrom, wenn dieser eine zentrale Adipositas (vgl. Tabelle 4) sowie zwei der in Tabelle 5 genannten Risikofaktoren aufweist¹⁰.

Tabelle 4

Spezifische Taillenumfänge der ethnischen Gruppierungen zur Diagnostizierung einer Adipositas nach der IDF Definition

Land/ ethnische Gruppierung	Geschlecht	Taillenumfang
Europäer	Männlich	≥ 94 cm
	Weiblich	≥ 80 cm
Südasiaten	Männlich	≥ 90 cm
	Weiblich	≥ 80 cm
Chinesen	Männlich	≥ 90 cm
	Weiblich	≥ 80 cm
Japaner	Männlich	≥ 90 cm
	Weiblich	≥ 80 cm
Ethnische Süd- und Mittelamerikaner		Keine Daten, vgl. Südasiaten
Afrikaner unterhalb der Saharan		Keine Daten, vgl. Europäer
Bevölkerung des östlichen Mittelmeers und des mittleren Ostens (Araber)		Keine Daten, vgl. Europäer

Tabelle 5

Definition der IDF zum Vorliegen eines metabolischen Syndrom erfordert zentrale Adipositas plus zwei der folgenden Kriterien.

Symptom	Pathologisches Kriterium
Erhöhte Triglyzeride	≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l) oder spezifische Behandlung für diese Lipidabnormalität
Reduziertes HDL – Cholesterol	< 40 mg/dl (1,0 mmol/l) bei Männer < 50 mg/dl (1,29 mmol/l) bei Frauen oder spezifische Behandlung für diese Lipidabnormalität
Erhöhter Blutdruck	Systolisch ≥ 130 mmHg, diastolisch ≥ 85 mmHg oder spezifische Behandlung eines zuvor diagnostizierten Hypertonus
Erhöhte Nüchtern-Glukosewerte	Nüchtern-Blutzucker ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l) (dabei wird OGTT empfohlen, ist jedoch nicht notwendig für die Bestimmung des Syndroms) oder zuvor diagnostizierter Diabetes mellitus Typ II

Als Reaktion darauf erarbeitete eine Expertenkommission um S. Grundy eine Revision der ATP III-Kriterien des NCEPs in Absprache mit American Heart Association und dem National Lung, Heart and Blood Institute. Ebenso wie in der Erstfassung liegt ein metabolisches Syndrom vor, wenn drei der fünf Kriterien erfüllt sind (Vgl. Tabelle 6)⁵. Zur Diagnose der Adipositas wird der Taillenumfang als adäquates Maß für das abdominale, viszerale Fett herangezogen. Im Gegensatz zum erhöhten Body Mass Index (BMI) korreliert ein erhöhter Taillenumfang gut mit dem kardiovaskulären Risiko¹¹. Der Grenzwert von 150 mg% für die Plasmatriglyzeride liegt um 50 mg% niedriger als bei Fettstoffwechselstörungen, aufgrund negativer Auswirkungen, die bereits bei dieser Plasmakonzentration nachweisbar sind. Bei den Werten des Cholesterins im Plasma spielen nur die niedrigen Konzentrationen des HDL-, nicht aber eine Erhöhung des LDL-Cholesterins eine Rolle als Komponenten des metabolischen Syndroms. Als Blutdruckgrenzwert verwendet man die gleiche Beschränkung wie bei Diabetes mellitus mit 130/85 mmHg. Dies mag daran liegen, dass der Blutdruck häufig mit anderen Komponenten des metabolischen Syndroms, vor allem aber mit der Insulinresistenz korreliert. Eine Änderung zu den ATP III Kriterien findet sich beim Nüchtern-Blutzucker. Hierbei wurde der Grenzwert von 110 mg% auf 100 mg% gesenkt. Ein manifester Diabetes mellitus wird nicht gefordert⁵.

Tabelle 6

Zur Erfüllung der Definition des „Metabolischen Syndroms“ nach AHA/NHLBI müssen drei von fünf Kriterien zutreffen.

Symptom	Pathologisches Kriterium
Zentrale Adipositas: Taillenumfang	Frauen ≥ 88 cm Männer ≥ 102 cm
Triglyzeride	≥ 150 mg% oder spezifische Therapie
HDL-Cholesterin	Frauen ≤ 50 mg%, Männer ≤ 40 mg% oder spezifische Therapie
Blutdruck	systolisch ≥ 130 mmHg oder diastolisch ≥ 85 mmHg oder antihypertensive Therapie
Nüchtern-Plasma-Glukose	≥ 100 mg% oder bekannter Typ 2 Diabetes

Die Fülle an verschiedenen Ansätzen zur Diagnosestellung zeigt, dass sowohl reges wissenschaftliches als auch wirtschaftliches Interesse an der Erkrankung des metabolischen Syndroms besteht. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass viele Zusammenhänge in der Entstehung und der Pathophysiologie noch nicht richtig verstanden, beziehungsweise erforscht worden sind^{5,11}. Die Unvollständigkeit dieser Diagnosekriterien zeigt unter anderem der Trend der letzten Jahre, der die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung mit ihrer breiten Spanne an Erscheinungsbildern als Teil beziehungsweise Manifestationsform des metabolischen Syndroms postuliert.

2.4 Die nicht-alkoholische Fettleber als Teil des metabolischen Syndroms

2.4.1 Epidemiologie

Die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) gehört zu den häufigsten Lebererkrankungen der Welt. Laut Schätzungen soll etwa ein Viertel der amerikanischen Bevölkerung davon betroffen sein^{12–15}. Sie zeichnet sich durch ein breites Spektrum an Manifestationsformen aus, welche von der normalen Steatose bis hin zu entzündlichen nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) oder sogar zur Leberzirrhose im Endstadium reichen können. Die Prävalenz der NASH in der westlichen Bevölkerung wird auf etwa ein Prozent geschätzt^{16–18}. Etwa 14% der Lebertransplantationen in den USA liegt eine NASH zugrunde¹⁹. NAFLD und NASH waren bisher hauptsächlich Erkrankungen der erwachsenen Bevölkerung. Jedoch hat sich mit dem Anstieg der Prävalenzen von Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II die Anzahl der Erwachsenen in allen Bürgerschichten massiv vermehrt sowie auf die Kinder ausgeweitet^{19–21}. NAFLD ist ein klinisches Krankheitsbild, das eng mit viszeraler Adipositas, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ II assoziiert ist²². Mittlerweile gibt es

einige überzeugende Beweisführungen, die die nicht-alkoholische Fettleber als eine Manifestation des metabolischen Syndroms in der Leber deuten^{16,17,22-31}. Für diese Hypothese sprechen Untersuchungen, welche zeigen, dass über 90% der Patienten mit NAFLD mindestens einen Aspekt des metabolischen Syndroms besitzen. Etwa 30% dieses Patientenguts zeigen sogar das vollständige Bild eines metabolischen Syndroms^{25,28,32-34}. Eine NASH ist häufig assoziiert mit Übergewicht (ca. 20%), nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (ca. 20%) sowie Hyperlipidämie (ca. 20%). Frauen, vor allem im mittleren Alter, sind häufiger betroffen als Männer³⁵⁻³⁹.

2.4.2 Nicht-alkoholische Steatose (NAFLD)

Die gesunde Leber enthält normalerweise einen Anteil von 0,8-1,5% Fett am Abtropfgewicht, welches histologisch nicht dargestellt werden kann. Ab einem Fettanteil von 2-3% können kleine Fetttropfen unter dem Lichtmikroskop wahrgenommen werden. Eine Lebersteatose enthält einen Absolutfettgehalt von 3-10%, hierbei sind kleine bis mittelgroße Lipidtropfen in einzelnen, disseminierten Leberzellen sichtbar. Die Diagnose der Fettleber ist definiert als der Fettgehalt über 10% mit Befall von mehr als 50% der Hepatozyten mit Lipidtropfen in unterschiedlicher Größe und diffusem Muster des Leberparenchyms³⁵.

Nach einer Mahlzeit mit hohem Fettgehalt kann eine temporäre Fettleber auftreten, insbesondere bei gleichzeitigem Alkoholgenuss. Wenn die Hepatozyten jedoch kontinuierlich mit Fettsäuren aus dem Intestinum beziehungsweise aus dem Fettgewebe belastet werden, verlieren diese ihre Oxidationsfähigkeit oder Synthesekapazität sowie die Bindungsfähigkeit von Triglyzeride an Lipoproteine. Die Balance der Fettspeicherung wird durch eine beschleunigte oder erhöhte Bildung von Triglyzeriden bei nicht ausreichender Kompensation durch Synthese der Lipoproteine oder adäquater Sekretion von VLDL gestört. Verantwortlich sind sowohl exogene als auch endogene pathogene Faktoren. Zu den exogenen Faktoren zählen unter anderem das erhöhte Angebot an Glyceridvorstufen oder auch eine gesteigerte enterale Lipidaufnahme. Als endogene Ursachen kommen sowohl die gesteigerte Lipolyse des Fettgewebes in Form einer massiv erhöhten Triglyzeridlipaseaktivität durch ACTH, Cortisol, Katecholamine, Prostaglandine, Coffein, Alkohol oder Nikotin als auch die Inhibition der Lipidverwertung in den Hepatozyten durch erniedrigte Verstoffwechselung durch β -Oxidation oder Mangel an Fettsäure-bindenden Protein oder gar Lipidstoffwechselstörungen der Hepatozyten selbst in Frage³⁵.

Initial sind nur wenige Hepatozyten mit kleinen Fettdepots gefüllt, später treten ganze Cluster auf, vor allem in der Peripherie der Lobuli oder in der zentroazinären Region. Die gespeicherten Lipidtropfen nehmen bei geeigneten Bedingungen immer mehr an Größe zu oder konfluieren, bis sie den ganzen Hepatozyten ausfüllen. Dieses Phänomen wird als makrovesikuläre Steatose bezeichnet^{35,40-43}. Folgen dieser Entwicklung sind neben der

Leberzellvergrößerung inklusive der Zerstörung feiner zytoplasmatische Strukturen sowie der Nekroseneigung unter mild hypoxischen Bedingungen die Bildung von Fettzysten³⁵.

2.4.3 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)

Erstmals beschrieb H. Thaler die histologischen Gesichtspunkte einer NASH^{35,44}, während J. Ludwig et al. den Terminus NASH erst später für eine chronische Lebererkrankung mit erhöhter Enzymaktivität mit dem histologischen Bild einer alkohol-induzierten Hepatitis einführten^{35,45}. Das Vorliegen einer NASH wird derzeit folgendermaßen definiert: Histologisch präsentiert sich eine moderate bis hochgradige hauptsächlich makrovesikuläre Fettdegeneration der Leberzellen mit entzündlichen Infiltraten und Fibrosierungen. Die Progression zur Leberzirrhose ist möglich. Trotz der histologischen Ähnlichkeiten sollte kein nennenswerter Alkoholkonsum oder eine virale oder autoimmunologische Beteiligung bestehen. Betroffene berichten von keinen oder nur moderaten subjektiven Beschwerden. Die Transaminasen sind im Normbereich oder leicht erhöht. NASH tritt häufig mit Übergewicht und/oder Diabetes mellitus auf und wird als Manifestation des metabolischen Syndroms verstanden. Wie bereits erwähnt, entsteht eine Lebersteatose aufgrund endogener oder exogener Noxen, die sich kombinieren und potenzieren können. Durch die zunehmende Fettspeicherung werden jedoch die Hepatozyten auch zunehmend anfälliger gegenüber Noxen. So könnte der oxidative Stress zu einer gesteigerten Oxidation von freien Fettsäuren in den Peroxisomen oder eine erhöhte Aktivität von Cytochrom P450 2E1 führen. Dies hätte eine Akkumulation von Biotoxometaboliten zur Folge, die entzündliche Infiltration und konsekutiv Fibrose provozieren. Trotz dieser Überlegungen ist die genauere Ätiopathogenese der NASH bisher noch nicht ganz verstanden. Ein weit verbreiteter Lösungsansatz war die sog. „second hit“ Hypothese. Als Grundlage beziehungsweise der sogenannte „first hit“ für die Entstehung einer NASH verstand man das Vorliegen einer Fettleber aufgrund von Hyperalimentation und Adipositas, die in Insulinresistenz übergehen³⁵. Jedoch führt das Vorliegen einer Fettleber nicht unbedingt zu einer NASH^{35,46,47}. Der „second hit“ erfolgt durch die Mobilisation von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe, vor allem bei zentraler Adipositas, in die Hepatozyten. Dies führt zu einer dramatischen Produktion von freien Radikalen aufgrund von oxidativem Stress mit Lipidperoxidation und Induktion von Zytokinen wie TNF- α , TGF- β , IL-1 und IL-8. Reaktiv folgt die Produktion von UCP 2 mit einem subsequenten ATP-Verlust der Hepatozyten sowie einer Macrophagen-Funktionsstörung mit gesteigerter Sensitivität zu Endotoxinen. Dies führt zu einer entzündlichen Reaktion, Zelltod und regenerativ zur Fibrose^{14,35,47,48}. Diese „two-hit“ Hypothese musste bereits einer „multiple-hit“ Hypothese weichen, deren Erforschung noch die Aufgabe der nächsten Jahre sein wird. Eine NASH ist mit größter Wahrscheinlichkeit, ähnlich wie Diabetes mellitus, eine polygenetische Erkrankung, die durch zahlreiche Umweltfaktoren und Stressoren beeinflusst

wird¹². Ein passender genetischer Hintergrund scheint ebenso bedeutsam zu sein. Es wird angenommen, dass eine genetische Beeinflussung das Ausmaß von oxidativem Stress, der Schwere der Steatose sowie die Regulation der Immunantwort und der Apoptose stattfindet³⁵.

Sowohl die Diagnosestellung als auch die Prognoseeinschätzung der NASH erfolgt über Leberhistologie. Morphologisch fällt eine diffuse makrovesikuläre Steatose in den Lobuli auf, die in Ausnahmen auch konzentriert mikrovesikulär und perivenös auftreten kann. Als Zeichen der Immunreaktion können granulozytäre und lymphozytäre Infiltrationen mit oder ohne fokale Nekrose dargestellt werden^{35,49}. Die Fibrose als regenerative Antwort auf die Inflammation beginnt in der perisinusoidalen Region und setzt sich anschließend im Portalfeld fort^{35,50}. Schließlich entwickelt sich eine überbrückende Fibrose, die zu einem architektonischen Umbau und letztendlich zur Zirrhose führt. Eine exakte histologische Diagnosestellung wird durch die morphologischen Ähnlichkeiten der NASH mit anderen chronischen Lebererkrankungen wie die Virushepatitis C, einer mit Steroiden behandelten Autoimmunhepatitis, einer medikamentös-toxischen Hepatitis oder der Frühform des Morbus Wilson erschwert. Aus diesem Grund muss häufig die Diagnose kryptogene Zirrhose gestellt werden^{14,35,42,49,51–58}.

2.4.4 Diagnostik von NAFLD und NASH

Klinisch präsentiert sich die Steatose relativ unauffällig und unspezifisch. Nicht selten bleibt diese Erkrankung unentdeckt oder wird als Zufallsdiagnose gestellt. Jedoch werden häufig Müdigkeit, Übersättigung, Krankheitsgefühl oder Appetitlosigkeit als subjektive Beschwerden genannt. Rechte Oberbauchbeschwerden treten bei Hepatomegalie auf, vor allem bei gebeugtem Oberkörper oder Seitenlage. Die Größe der Leber korreliert hierbei mit der Schwere der Fettleber. Zusätzlich ist bei etwa einem Viertel der Patienten eine Splenomegalie palpabel³⁵. Im Endstadium der Leberzirrhose mit portalen Hypertonus lassen sich die typischen Stauungszeichen, die Leberhautzeichen und möglicherweise eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion im EKG nachweisen^{35,59}. In 80-90% der Fälle vor allem bei einer schweren Fettleber oder NASH verschieben sich einige Laborparameter in den pathologischen Bereich. Initial steigen die Werte der γ -GT an, danach folgen GPT und GOT. Der DeRitis-Quotient ist hierbei eine Möglichkeit, um eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die metabolisch bedingt ist, von einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH), welche durch toxische Noxen hervorgerufen wird, abzugrenzen. So liegt dieser Wert bei der NASH < 1 und bei der ASH > 1 . Der DeRitis-Quotient wurde erstmal 1965 durch DeRitis et al. als Unterscheidungskriterium von viralen und anderen Lebererkrankungen eingeführt. Zur Bestimmung des Werts wird die Division von Serum-GOT durch Serum-GPT herangezogen. Die Unterscheidung erfolgt dadurch, dass GOT leberunspezifisch vor allem in

den Mitochondrien und GPT vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten lokalisiert ist. Sollte eine pathologische Veränderung der Cholinesterase im Serum auftreten, deutet dies auf eine Störung des Lipidstoffwechsels oder auf eine Fettleber hin. Mit der Galactose Eliminationskapazität oder durch den Indocyanin-Grün-Test können schon im Frühstadium oder in den Kontrolluntersuchungen Einschränkungen der Leberfunktion festgestellt werden. Zusätzlich sollten Analysen der alkalischen Phosphatase, Bilirubin, Ferritin, Leptin, Thioredoxin und einiger Laborparameter des Lipidstoffwechsels ebenso wie eine Elektrophorese durchgeführt werden^{35,60–64}. Deutlich erhöhte Laborparameter korrelieren stark mit der Schwere und der Progression der Erkrankung. Des Weiteren sollte beim sonographischen Nachweis einer Steatose ein Screening nach Diabetes mellitus durchgeführt werden^{35,37,46,53,54,58,62,65}. Als nicht-invasive Bildgebung bietet sich in erster Linie die Sonographie, aber auch das CT und zur Quantifizierung des Fettanteils auch das MRT an. Da jedoch nur die Morphologie für die endgültige Diagnosestellung einer Fettleber entscheidend ist, sollte eine Leberbiopsie entweder perkutan oder laparoskopisch entnommen werden. Außer den Fettveränderungen liegt natürlich das Augenmerk auf dem Erkennen einer entzündlichen Reaktion sowie Zeichen einer progressiven Fibrose^{35,65}. Entscheidend für die Prognose ist ein Grading und Staging anhand des gewonnenen Leberprofils^{35,52}. Der Nutzen einer laparoskopischen Evaluation der Leberoberfläche, um gezielte Leberbiopsien aus möglicherweise pathologischen Regionen zu entnehmen, ist fragwürdig³⁵.

2.4.5 Prognose von NAFLD und NASH

Prognostisch günstig verläuft eine Fettleber ohne fibrotische Prozesse, da diese bei Ausschaltung der auslösenden Noxen vollkommen reversibel ist. Eine Fettleber sollte jedoch nicht unterschätzt werden. Zahlreiche Leberfunktionen können entscheidend beeinträchtigt werden, so dass unerwünschte Effekte der Leber sowie dem ganzen Organismus schaden können. Zudem führen Fettveränderungen in den Hepatozyten zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber Noxen oder Toxinen, wodurch die Tendenz zur Steatonekrose mit eingeschränkter Regenerationsfähigkeit zu erklären ist. Des Weiteren reagiert eine Fettleber stark auf entzündliche Reize mit einer mesenchymalen Reaktion. Schwere Formen können schließlich die hepatischen Gefäßsysteme einengen, was eine Behinderung des billären und hämodynamischen Flusses zur Folge hat. Eine NASH entwickelt sich in 10-40% der Fälle zur Fibrose oder Zirrhose innerhalb von fünf bis zehn Jahren. Aus diesem Patientengut versterben etwa 10-15% innerhalb von zehn Jahren an den Komplikationen der Zirrhose. Zu den Risikofaktoren für eine progressive NASH zählen unter anderem ein BMI > 30, Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie, Alter über 50 Jahren, der DeRitis-Quotient > 1, Thrombopenie sowie die Anwesenheit von Mallory-Denk-Körperchen^{35,46,54,56,57,66}.

2.5 Ätiopathogenese des metabolischen Syndroms inklusive der nicht-alkoholischen Fettleber

Aktuelle Zahlen deuten darauf hin, dass etwa ein Viertel der westlichen Bevölkerung am metabolischen Syndrom erkrankt ist. Es werden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede beobachtet, dem individuellen genetischen Hintergrund hingegen wird eine bedeutsame Rolle eingeräumt²². Adipositas, Insulinresistenz und einige unabhängige Faktoren werden als drei ätiologische Kategorien für das metabolische Syndrom angesehen, die je nach Autor unterschiedlich stark gewichtet werden. Laut ATP III ist die sogenannte „Adipositas-Epidemie“ hauptverantwortlich für die stetig steigende Anzahl von Fällen. Massives Übergewicht bewirkt im menschlichen Organismus einen Anstieg des systemischen Blutdrucks, des Blutzuckerspiegels sowie des Gesamtcholesterins im Serum. Vor allem VLDL- und LDL-Cholesterol steigen hierbei massiv an, während jedoch die Serumkonzentration des protektiven HDL-Cholesterol absinkt. Insbesondere die abdominale Adipositas korreliert stark mit metabolischen Risikofaktoren auch für kardiovaskuläre Ereignisse⁵. Exzessiv vermehrtes viszerale Fettgewebe, das normalerweise nur fünf bis zehn Prozent der Gesamtkörpermasse ausmacht, ist metabolisch aktiver und wirkt zudem als endokrines Organ. Es werden sowohl Hormone als auch Zytokine und diverse Substrate mit negativer Auswirkung auf den Stoffwechsel sezerniert¹¹. Besondere Aufmerksamkeit wird den sogenannten Adipo-(zyto)kinen TNF- α , IL-6, Leptin, Adiponektin und Visfatin zuteil^{16,67}. Folglich eignet sich der Taillenumfang als Kriterium des metabolischen Syndroms. Das viszerale Fettgewebe ist gegenüber lipolytischen Stimuli sehr anfällig, dadurch kommt es zur massiven Anschwemmung von freien Fettsäuren (free fatty acids = FFA) in der Pfortader^{11,16,68}. Erhöhte FFA-Plasmakonzentrationen, wie sie auch bei NAFLD und NASH üblich sind, sorgen für eine Überladung von Muskel- und Lebergewebe mit Lipiden. Dies führt zur Steatose und Insulinresistenz. In der Leber werden die FFA in Lipoproteine eingebaut, was ursächlich für die Hypertriglyzeridämie sowie der niedrigen HDL-Cholesterin Konzentration sein soll. Zudem verhindern hohe FFA Spiegel die Glukoseverwertung im Muskel, fördern aber die Glukoneogenese in der Leber, was zu hohen Blutzuckerspiegeln führt, die wiederum eine reaktive Hyperinsulinämie zur Folge haben¹¹. Lipide können aber auch nicht-oxidative Pfade einschlagen und somit Zellschäden oder sogar Zelltod verursachen. Die Schwere der Erkrankung korreliert hierbei mit den Plasmawerten⁶⁹. Es wurde ebenso wie bei proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere TNF- α , eine erhöhte lysosomale Permeabilität bei Akkumulation von FFA beobachtet. Dies lässt vermuten, dass FFA die hepatische Lipotoxizität verursachen⁷⁰ und die Expression von TNF- α induzieren können¹⁶. Bei adipösen Patienten wird häufig ein proinflammatorischer Status beobachtet. Grund hierfür ist die gesteigerte Produktion von Zytokinen^{11,67}, vor allem der TNF- α , das IL-6 und das CRP in

Leber und Fettgewebe¹¹. Zytokine sind Schlüsselmediatoren für hepatische Inflammation, Zelltod, Cholestase sowie für Fibrose und Regeneration nach dem Leberschaden. Die Produktion von TNF- α und IL-6 als prototypische, proinflammatorische Zytokine ist häufig das erste Ereignis nach einem Leberschaden und führt zur Induktion weiterer Zytokinen sowie zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen und zur Stimulation der regenerativen Fibrose¹⁶.

Sowohl Antikörperneutralisationsstudien⁷¹ als auch Experimente mit Mäusen, die einen Defekt im TNF- α Rezeptor Typ 1 besitzen⁷², haben gezeigt, dass TNF- α eine Schlüsselrolle bei der Leberregeneration besitzt¹⁶. Patienten mit NASH und Fibrose weisen eine erhöhte Expression von TNF- α inklusive von TNFR1 auf⁷³. Ferner konnte bei der NASH eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu einer Steatose nachgewiesen werden⁷⁴, welche möglicherweise auf die erhöhte Aktivität von NF- κ B, den Mastertranskriptionsfaktor für viele proinflammatorische Mediatoren, sowie der Expression von TNFR1 zurückzuführen ist^{74,75}. Die erhöhte TNF- α Expression kann entweder parallel oder mit einer verstärkten Apoptoserate verbunden auftreten¹⁶. Durch Phosphorylierung des Insulinrezeptors sowie des IRS-1 bewirkt TNF- α direkt die Verminderung der Insulinaktivität⁷⁶. Es beeinträchtigt die Bildung von Glukosetransportern, insbesondere GLUT-4 sowie die Expression von Adiponektin, während die Lipolyse gefördert wird¹¹. Es ist eine wohl etablierte Tatsache, dass TNF- α somit die systemische und hepatische Insulinsensitivität beeinflusst, was auch TNF- α Polymorphismen mit einer Anfälligkeit für Insulinresistenz aufzeigen. Folglich wird der Wert dieses Zytokins im Wechselspiel zwischen Fettakkumulation, Insulinaktivität und Inflammation im menschlichen Organismus unterstrichen^{16,77}. Studien bestätigen die essentielle Rolle von TNF- α in der Entstehung von Insulinresistenz sowie NASH, die eine Besserung der Lebererkrankung durch die antikörpervermittelte Neutralisation von TNF- α ^{16,78,79} oder via Suppression durch Metformin⁸⁰ beziehungsweise durch PPAR γ -Liganden wie Pioglitazon^{16,81–83} erzielen. Ähnliche Ergebnisse konnten Studien mit diätetischen oder genetischen Design bei Versuchstieren mit Mangel an TNF- α oder dessen Rezeptoren erreichen⁸⁴.

Eine weitere entscheidende Bedeutung zur Entwicklung von Insulinresistenz wird dem Adipokin IL-6 zugeschrieben, das bei Adipositas im Vergleich zum Gesunden deutlich erhöht ist. Es hemmt die Bildung von Glukosetransportern und somit wahrscheinlich den Glukosetransport sowie die Glukoseverwertung. Ähnlich wie TNF- α hemmt es die Lipogenese und fördert die Lipolyse, um vermehrt FFA aus dem Fettgewebe freizusetzen. IL-6 bewirkt zudem die Produktion von TRH, GH und CRH sowie die Hemmung der TSH-Freisetzung. TNF- α und IL-6 stimulieren die hepatische Produktion des Inflammationsproteins CRP, das bei adipösen Patienten mit einem metabolischen Syndrom meist erhöht im Serum vorliegt. Der dadurch begünstigte niedriggradige proinflammatorische Status

fördert die Immunopathogenese der Arteriosklerose. Veränderungen in der Aktivität verschiedener Lipasen wie der Lipoproteinlipase, der hepatischen Triglyzeridlipase und der hormonsensitiven Lipase begünstigen die beim metabolischen Syndrom typische Dyslipidämie¹¹. Auch den sogenannten prothrombotischen Status im metabolischen Syndrom führt man auf die mit Adipositas assoziierten erhöhten PAI-1 Spiegel im Serum zurück. Insgesamt sieht ATP III im metabolischen Syndrom vor allem eine Sammlung von metabolischen Komplikationen der Adipositas⁵.

Im Gegensatz dazu sehen viele Wissenschaftler im metabolischen Syndrom pathophysiologisch im Wesentlichen die Insulinresistenz. Hierbei wird sie als Hauptursache zusammen mit der Hyperinsulinämie für viele Risikofaktoren der Erkrankung verstanden^{4,11,16,85–87}. Da jedoch die Insulinresistenz zusammen mit dem Körperfett stetig ansteigt, ist eine genauere Differenzierung der einzelnen Rollen erschwert. Bei einem BMI jenseits der 30 kg/m² haben die meisten Patienten eine postprandiale Hyperinsulinämie mit einer relativ erniedrigten Insulinsensitivität. Obwohl die zentrale Rolle der Insulinresistenz in der Pathogenese des metabolischen Syndroms umstritten ist, werden doch wesentliche pathophysiologische Mechanismen auf diese zurückgeführt⁵. Insulinresistenz tritt auf, wenn Zellen in der Leber, im Skelettmuskel oder Fettgewebe weniger sensitiv und letztendlich resistent gegenüber Insulin reagieren. Somit kann Glukose aus dem Blut nicht mehr in die Zellen aufgenommen werden, was eine Hyperglykämie zur Folge hat. Um den Glukose-Stoffwechsel aufrechtzuerhalten, muss somit mehr Insulin produziert werden. Diese Reaktion mündet in eine Hyperinsulinämie. Hohe Insulinspiegel bewirken eine erhöhte sympathische Aktivität, die wiederum arteriellen Hypertonus und verminderte Fibrinolyse auslöst¹¹. Die gesteigerte Hormonproduktion schwächt die β -Inselzellen des Pankreas, bis diese den geforderten Insulinspiegel nicht mehr aufrechterhalten können. Es entwickelt sich ein sekundärer Insulinmangel, der durch die Hyperglykämie final als Diabetes mellitus Typ II diagnostiziert wird. Schon vorher treten diverse Schäden im Körper auf, inklusive eines Triglyzeridaufbaus, der noch weiter die Insulinresistenz fördert¹⁰. So entlassen die bereits mit Lipid überladenen Muskelzellen in der Insulinresistenz vermehrt FFA, die eine Steatose der Leber und arteriosklerotische Dyslipidämie begünstigen. Hinzu kommt die freisetzende Wirkung der Hyperinsulinämie auf die VLDL-Triglyzeride. Insulinresistenz im Muskel prädisponiert Glukoseintoleranz, die noch durch verstärkte Glukoneogenese der insulinresistenten Leber verschlimmert werden kann. Je nach Faserzusammensetzung ist der Skelettmuskel in der Lage, Glukose aufzunehmen und zu oxidieren. Bei Insulinresistenz sind die weniger aktiven Typ IIb Fasern vermehrt, während die aktiven Typ I Fasern vermindert sind. Zudem ist der nicht-oxidative Stoffwechsel der Glykogensynthese gestört. Auch der beim metabolischen Syndrom auftretende arterielle Hypertonus kann durch einige Mechanismen auf die Insulinresistenz zurückgeführt werden¹¹.

Das neuroendokrin wirksame Leptin hemmt die Energieaufnahme und steigert den Energieverbrauch. Leptin mobilisiert zudem vermehrt Fettsäuren aus dem Fettgewebe und begünstigt deren Oxidation im Muskelgewebe. Somit wird die Lipogenese gehemmt, während die Lipolyse gesteigert wird. Im Glukosestoffwechsel hemmt es die insulin-stimulierte Glukoseverwertung, die Insulinbindung, den Glukosetransport und steigert die Glykogenolyse. Zum Status der Insulinresistenz gehören auch erhöhte Plasma-Leptin-werte¹¹. Studien mit ob/ob Mäusen, die einen Defekt im Leptin-Gen besitzen, zeigen eine rasche Entwicklung von Insulinresistenz und Steatose in den Versuchstieren^{12,88}, jedoch nur milde chronische Inflammation und keine Fibrose. Diese kann jedoch durch exogene Gabe induziert werden^{16,89}. Aus diesem Grund wird Leptin als essentieller Faktor für die Leberfibrose angesehen¹⁶.

Wie bereits der Name vermuten lässt, bewirkt das Hormon Resistin die Insulinresistenz, indem es die Glukoseaufnahme in verschiedene Gewebe inhibiert. Des Weiteren wird eine Assoziation zu TNF- α , IL-6 und 1p-Phospholipase A vermutet¹¹.

Peroxisome proliferator-activated receptors sind Zellkernrezeptoren, die als Transkriptions-faktoren die Expression von Genen des Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels regulieren. Für das metabolische Syndrom sind alle drei Isoformen von Bedeutung, da sie in vielen insulinsensitiven Geweben, insbesondere dem Fettgewebe, produziert werden. PPAR- γ verbessert die Insulinsensitivität und senkt den Insulinspiegel im Kohlehydratstoffwechsel. Im Fettstoffwechsel führt die Aktivierung zur verminderten Akkumulation von oxidierten und glykiertem LDL. Im Blut ist eine Erhöhung von HDL-Cholesterin und eine Verminderung der Triglyzeride sowie der small-dense LDL Partikel auffällig¹¹. Ip et al. (2003) untersuchten mit einer Methionin-Cholin-Mangeldiät (MCD Diät) die Bedeutung der Signale von PPAR- α in der Entwicklung einer fibrosierenden Steatohepatitis und musste feststellen, dass PPAR- α -Null-Mäuse eine schwerere Steatohepatitis ausbildeten als Wildtyp-Mäuse. Dies könnte einen Indikator für die Rolle von PPAR- α in der Pathogenese der NASH darstellen^{12,90}.

Der bedeutendste Faktor bei der Entwicklung einer Insulinresistenz ist das Hormon Adiponektin. Bei Patienten mit viszeraler Adipositas, Insulinresistenz, NASH⁹¹, Diabetes, Lipodystrophie, Hypertonie, Dyslipidämie, koronarer Herzkrankheit, akutem Koronarsyndrom sowie Rauchern werden erniedrigte Plasmakonzentrationen beobachtet, obwohl es im Fettgewebe produziert wird^{11,16,92–95}. Somit korrelieren niedrige Plasma-Adiponektinspiegel negativ mit dem prozentualen Anteil an Körperfett, zentraler Adipositas und Insulin-resistenz¹⁶. Eine Erklärung hierfür ist die inhibitorische Wirkung des TNF- α auf die Adiponektin-Expression, wobei IL-6 und Dexamethason eine ähnliche Wirkung besitzen. Die negative Korrelation der Adiponektinsynthese mit der proinflammatorischen Zytokin-produktion konnten Studien mit adiponektin-defizienten Mäusen nachweisen, die hohe Werte der mRNA von TNF- α im Fettgewebe und hohe TNF- α Plasmaspiegel aufwiesen⁹⁶.

Insgesamt gibt es drei Arten von Rezeptoren für dieses Hormon: AdipoR1 wird hauptsächlich im Fettgewebe ausgebildet, während AdipoR2 vor allem in der Leber exprimiert wird⁹⁷. Zudem wirkt T-Cadherin mit einer breiten Gewebsverbreitung zusätzlich als Rezeptor⁹⁸. Adiponektin wirkt antiatherogen durch Hemmung von ICAM, VCAM und E-Selectin. Diese Substanzen ermöglichen die Migration von Monozyten in die subendotheliale Schicht und somit die Entstehung von Schaumzellen. Adiponektin besitzt auch neben der anti-inflammatorischen Wirkung, welche durch die Induktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonist sowie die Suppression von IL-6 und Interferon- γ ^{99–101} charakterisiert ist, eine vasodilatatorische Komponente¹¹. Im Falle der NASH konnte eine Korrelation zwischen Hypoadiponektämie mit hepatischer Insulinresistenz und hepatischem Fettgehalt¹⁰² hergeleitet werden. Etwas umstrittener ist die Verbindung mit verstärkt auftretender Necroinflammation und Fibrose¹⁰³. In Tierstudien konnten positive Effekte von Adiponektin sowohl in NASH als auch in ASH nachgewiesen werden. Neben der Hepatomegalie nahmen die Steatose, die GPT-Levels und die TNF- α Expression in den ob/ob Mäusen ab¹⁰⁴. Daneben konnte gezeigt werden, dass Adiponektin die Progression der Fibrose hinauszögert, da hepatische Sternzellen AdipoR1/R2 mRNA exprimiert, wodurch Adiponektin deren Migration und Proliferation sowie die Expression von TGF β 1, den Hauptaktivator der Synthese von Proteinen extraellulärer Matrix, inhibiert¹⁰⁵. Es wird vermutet, dass die positive antiinflammatorische und insulinsensibilisierende Wirkung von PPAR- γ -Liganden in NAFLD Patienten auf einer Adiponektin Stimulation und TNF- α Suppression beruht¹⁶.

Schließlich werden einige unabhängige Faktoren für spezifische Komponenten des metabolischen Syndroms als dritte ätiologische Kategorie verstanden. Erwähnenswert hierbei ist der Lipoprotein-Stoffwechsel, der durch eine Reihe von genetischen Variationen moduliert wird. Sowohl die Dyslipidämie als auch die Blutdruckregulation spielen wichtige Rollen bei der Ätiopathogenese, sind jedoch auch abhängig von der Entwicklung einer Adipositas. Die Blutzuckerwerte werden sowohl von der Insulinsekretion als auch von der Insulinsensitivität beeinflusst⁵. Ferner gelten neben einem fortgeschrittenen Alter¹⁰⁶ auch einige endokrine Faktoren als Risikofaktoren. Kürzlich wurde auch der proinflammatorische Status als direkter Verursacher für eine Insulinresistenz sowie für Arteriosklerose entdeckt⁵.

2.6 Hochfettdiäten

2.6.1 Allgemeines

Da die Pathogenese des metabolischen Syndroms, insbesondere der Entwicklung von NAFLD zu NASH, noch nicht vollständig verstanden ist, hat die Erforschung dieser Zusammenhänge großes Interesse in der Forschung erregt. Als geeignete Werkzeuge etablierten sich hierbei verschiedene Tiermodelle, die jedoch zum Teil nur begrenzt aussagekräftig sind. Aus diesem Grund sollten Studien, die den Phänotyp pharmakologisch, wie das Gold–Thioglukose Maus–Modell, oder durch monogenetische Veränderungen, wie zum Beispiel ob/ob-Mäuse⁷⁸ oder fa/fa-Zuckerratten, nur mit Vorsicht interpretiert werden¹⁰⁷. Obwohl diese Tierstämme, die einen Defekt im appetitunterdrückenden Hormon Leptin (ob/ob) oder dessen Rezeptor (fa/fa) besitzen^{108–110}, an Insulinresistenz, Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Steatose leiden, ähnlich dem menschliche Korrelat des metabolischen Syndroms^{67,108,109}, bilden diese Modelle die menschliche Physiologie mit hohen Leptinspiegeln bei Adipositas nicht ab^{16,60}. Physiologischere Ansätze sind hierbei diätetisch orientierte Tiermodelle.

2.6.2 Wirkung von Hochfettdiäten auf den Metabolismus

Bereits 1959 beschrieben Masek und Fabry die erste diätische Intervention zur Entstehung von Adipositas in Versuchstieren mit einem fettreichen Futter, einer sogenannten Hochfettdiät^{27,111}. Die zahlreichen Folgestudien verschiedener Autoren konnten zudem die Wirksamkeit von Hochfettdiäten auf die Entstehung von Hyperglykämie, Ganzkörper-Insulinresistenz sowie Effekte auf Muskelzellen, auf die Insulin Signaltransduktion und die Leberphysiologie nachweisen. Eine Fütterung mit einer fettreichen Diät über einen längeren Zeitraum führt zur Gewichtszunahme von 10-20% gegenüber einer Kontrolle mit Standard-Nagerfutter. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei jungen Versuchstieren bei einer Fütterung über mehrere Wochen hinweg. Der vollständige adipöse Phänotyp tritt nach vier Wochen in Erscheinung^{107,112}. Zudem treten nach einigen Wochen sowohl bei Hochfettdiäten mit tierischem als auch mit pflanzlichem Fett als Basis, moderate Hyperglykämien, erhöhte Nüchternwerte des Blutzuckers, des Plasmainsulinspiegels und der Plasmatriglyzeride auf¹⁰⁷. Ebenso wird die insulininduzierte Glukoseaufnahme in den Skelettmuskeln gegenüber Kontrollen in einem Bereich von 30-60% schon nach sehr kurzer Fütterungszeit beeinträchtigt^{107,113}. Ursächlich ist eine frühe Störung im Insulinsignalpfad und spiegelt somit eng die Pathogenese der menschlichen mit Adipositas assoziierten Insulinresistenz wieder^{107,114}. Durch die reduzierte adrenalinabhängige Lipolyse tritt sowohl eine Hyperplasie als auch eine Hypertrophie der Adipozyten auf^{107,115}. Zudem konnte eine erhöhte Expression von inflammatorischen Genen im Sinne eines proinflammatorischen Status in diätischen adipösen Mäusen nachgewiesen

werden^{107,116}. Sowohl im weißen als auch im braunen Fettgewebe ist die Glukoseaufnahme durch Insulin reduziert^{107,117–119}. Viele Autoren sehen in der Lipotoxizität von freien Fettsäuren auf die β -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas den hauptsächlichen Pathomechanismus bei der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2^{107,120–122}. Obwohl bei Hochfettdiäten ein Überfluss an freien Fettsäuren in β -Zellen auftritt¹²³, konnten bisher nur wenige Tierstudien die β -zelluläre Lipotoxizität nachweisen¹⁰⁷. Wohl etabliert ist aber die Tatsache, dass Hochfettdiäten zu hepatischer Steatose führen^{107,124}. Studien beweisen, dass diese Gegebenheit in vivo mit hepatischer Insulinresistenz verbunden sein muss^{27,125,126}. Jedoch haben Insulinsignalstudien ergeben, dass die typischen Störungen von Muskel- und Fettgewebe nicht einfach auf die Leber repliziert werden können^{107,124}. Zusammenfassend erzielen Hochfettdiäten hepatische Steatose inklusive der Zeichen von hepatischer Insulinresistenz ähnlich dem menschlichen adipösen Status im gesamten Versuchstier. Die diätetische Aktivierung von hepatischen Inflammationswegen wäre zudem die gesuchte Verknüpfung zwischen diätischer Fettdeposition und nicht-alkoholischer Steatohepatitis¹⁰⁷.

2.6.3 Design von Hochfettdiäten

Ausgehend von diesen Erfahrungen werden Hochfettdiäten als ein gültiges Werkzeug für Tiermodelle des metabolischen Syndroms mit Insulinresistenz und eingeschränkter β -Zellfunktion verstanden^{27,127–129}. Beim Studium der Literatur wird jedoch schnell ersichtlich, dass die unterschiedlichsten Diäten als Hochfettdiäten bezeichnet werden. Da es keine genaue Definition gibt, sind weder Menge noch Zusammensetzung der Fettanteile standardisiert. So existieren Diätkompositionen mit einem Energieanteil an Fett zwischen 20–60%. Die Basis der Diät variiert von tierischen Fetten, wie Schweineschmalz oder Rindertalg, bis hin zu pflanzlichen Ölen wie Maiskeim- oder Safloröl. Zudem konkurrieren wohldefinierte, halbgereinigte Diäten, in denen der Kohlenhydrat- und/oder der Proteinanteil durch Fett ersetzt wurde, mit Diäten, bestehend aus einem Standardfutter, dem zusätzlich Fett hinzugefügt wurde. Dies führt zu unausgereiften Diätkompositionen sowohl im Bereich der Makro- als auch der Mikronährstoffe. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass eine enorme Bandbreite an Phänotypen mit unterschiedlichsten Ergebnissen in Hochfett-Studien auftreten. Die meisten Studien setzen nur eine einzelne Fettkomposition mit einer Standardfutter-Kontrolle ein, ohne jedoch den Einfluss dieser spezifischen Fettkomponente zu analysieren²⁷. Bisherige Studien, die einzelne Diätvarianten miteinander verglichen, ergaben, dass Hochfettdiäten mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren (SFA) den für Hochfettdiäten typischen Phänotyp entwickeln, während Diäten mit mehrfach ungesättigten ω -3 Fettsäuren (PUFA) einen positiven Einfluss auf Körperzusammensetzung sowie Insulinsensibilität besitzen^{130,131}. Büttner et al. untersuchten daraufhin die Rolle von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) im Vergleich zu SFA und PUFA in einer Hochfett-

Studie²⁷. Hierbei erhielten männliche Wistar-Ratten in einem Zeitraum von zwölf Wochen unterschiedliche Hochfettdiäten, die jeweils 42% Energieanteil aus einer der folgenden Fettquellen besaßen: Kokosnussfett (SFA), Olivenöl (MUFA), Schweineschmalz (SFA und MUFA) und Fischöl (PUFA). Versuchstiere mit Hochfettdiäten auf Schmalz- und Olivenölbasis wiesen einen stark adipösen Phänotyp sowie Insulinresistenz und hepatische Steatose mit Aktivierung von SREBP1c auf. Ähnliche Ergebnisse in abgeschwächter Form konnten bei der Kokosfettdiät aufgezeigt werden²⁷. Es stellt sich nun die Frage, welcher Hochfettdiättyp als Modell für die metabolische Störung, die in der menschlichen Adipositas beobachtet wird, am geeignetsten zu sein scheint. Diätvarianten auf Basis von Tierfetten oder pflanzlichen Ölen, die ω -6/ ω -9 Fettsäuren enthalten, können zur Generierung eines adipösen und insulinresistenten Phänotyp verwendet werden¹⁰⁷.

3. Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Diese Studie entstand im Rahmen des Forschungsbundes „Fibrose-Entstehung und -Progression bei NASH“ der Universitätsklinik Regensburg, an dem die Kliniken und Polikliniken für Innere Medizin I, Chirurgie, die Institute für Pathologie, Funktionelle Genomik und Klinische Chemie sowie Laboratoriumsmedizin beteiligt sind. Der Schwerpunkt dieser Studienreihe liegt bei der Erforschung von molekularen Mechanismen der FibroseProgression bei der nicht-alkoholischen Steatohepatitis und der Suche nach „third-hit(s)“.

Es wird angenommen, dass das Metabolische Syndrom der Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer nichtalkoholischen Steatohepatitis ist. Jedoch tritt nur bei einer Untergruppe dieser Patienten ein progredienter Verlauf der Fibrosierung des Lebergewebes bis hin zur kompletten Zirrhose auf. Hierbei variieren sowohl das Ausmaß des fibrotischen Umbaus, als auch der zeitliche Ablauf deutlich. Aktuell gilt die NASH als häufigste Lebererkrankung der westlichen Industrienationen mit steigender Inzidenz. Die bekannten pathophysiologischen Schritte von der Lipidakkumulation in den Hepatozyten (steatosis hepatis), der Entzündungsreaktion (Steatohepatitis) bis hin zur Fibrose werden jeweils durch Insulinresistenz potenziert. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen hingegen sind noch weitgehend ungeklärt. Ebenso konnte noch keine hinreichende Erklärung für den unterschiedlichen individuellen Krankheitsverlauf gefunden werden. Zeitgenössische Studien favorisieren die Hypothese, einer Progression der Steatosis zur Entzündung beziehungsweise der reaktiven Fibrosierung, die jeweils durch sogenannte „hits“ verursacht werden. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung geeignete Tiermodelle zu entwickeln. Vom wissenschaftlichen und auch ethischen Standpunkt aus betrachtet, ist es zudem wichtig, dass nicht nur der Phänotyp, sondern auch die Pathogenese der Erkrankung im Tiermodell die menschliche NASH abbildet.

Aktuelle Studien erreichten bisher nur unter Zuhilfenahme eines unphysiologischen Designs Aspekte des metabolischen Syndroms inklusive einer NASH in Versuchstieren abzubilden. Das metabolische Syndrom sowie die NASH sind polygenetische Erkrankungen, die durch zahlreiche Umweltfaktoren und -stressoren beeinflusst werden^{12,107}. Da Wildtyptiere keine spontane NASH ausbilden, gibt es bisher kein Tiermodell, welches identisch mit der menschlichen Erkrankung ist¹². Ein physiologischerer Ansatz ist die Verwendung von fettreichen Diäten, sogenannte Hochfettdiäten, um adipöse Tiere zu generieren. Diese speziellen Futtersorten fördern Hyperglykämie und Insulinresistenz im gesamten Organismus. Viele Studien haben diese Effekte auf die Leber- und Muskelphysiologie untersucht. Ausgehend von diesen Ergebnissen und Erfahrungen ist allgemein anerkannt, dass Hochfettdiäten ein metabolisches Syndrom mit Insulinresistenz und unterdrückter

β -Zellfunktion hervorrufen können^{107,127–129}. Die Bezeichnung Hochfettdiät wird jedoch für eine große Anzahl an Tierfutter verwendet ohne eine genaue Definition zu besitzen. Weder die genaue Fettmenge noch die Fettkomposition wurde bisher standardisiert¹⁰⁷.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines diätetischen Tiermodells der NASH, das in essentiellen pathogenetischen Aspekten und im Hinblick auf Lebermetabolismus und Expressionsprofil proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren mit der menschlichen Fettlebererkrankung übereinstimmt. Ferner soll durch diätetische Interventionen eine Modifikation der erzeugten NASH erreicht werden. Vor allem der Einfluss der Fettkomponente der Diäten auf Inflammation und metabolische Veränderungen in den Versuchstieren soll untersucht werden.

4. Material und Methodik

4.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen standen männliche Wistar-Ratten im Alter von sechs bis acht Wochen aus der Züchtung von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) zur Verfügung. Die Tiere lebten je in Fünfergruppen bei normaler, nicht-steriler Haltung in handelsüblichen Käfigen und Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf zu zwölf Stunden. In diesem Experiment nahmen insgesamt 35 Tiere, aufgeteilt in sieben Gruppen, teil. Hierbei erhielten die Tiere acht Wochen ad libitum Zugang zu Wasser und Futter in Form von verschiedenen Variationen der atherogenen Diät nach Paigen. Die Diäten wurden in Pelletform von ssniff GmbH (Soest, Deutschland) aufbereitet. Einmal pro Woche fand eine Kontrolle der Gewichtszunahme und des Futterverbrauchs innerhalb von 24 Stunden statt. Die Tötung der Tiere mit anschließender Vorbereitung zur Organentnahme erfolgte nach acht Wochen mittels CO₂ aus der Laborversorgung. Die Tierhaltung und die Behandlungsmethoden der Versuchstiere entsprachen den Vorgaben des „deutschen Tierschutzgesetzes“ sowie dem „UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals“ Jahrgang 2010.

4.2 Tierdiäten

Die Versuchstiere wurden acht Wochen lang mit speziellen Hochfettdiäten gefüttert, um ein metabolisches Syndrom, inklusive einer NASH, hervorzurufen. Zu diesem Zweck entschieden wir uns die atherogene Diät nach Paigen als Basis für mehrere Diätvarianten zu verwenden. Ende der 1980er Jahre entwickelte eine Forschungsgruppe um B. Paigen¹³² die sogenannte atherogene Diät nach Paigen (AD), um arteriosklerotische Läsionen in genetisch veränderten Mäusen hervorzurufen. Da die Diäten bis zu dieser Zeit unspezifisch und keine einheitliche Qualität und Quantität der Bestandteile besaßen, formulierte die Forschungsgruppe aus einer ursprünglichen Diät und weiteren Zusätzen eine synthetische Hochfettdiät. Folgen dieser Kombination waren erhöhte Cholesterinspiegel in Verbindung mit erhöhten Plasmatriglyzeriden. Diese Veränderungen in den Blutfettwerten sind essentiell für die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen sowie für einige andere klinischen Symptome des metabolischen Syndroms. Mittlerweile hat sich die AD als Hochfettdiät etabliert. In vielen Studien konnte ihre Wirksamkeit, ein metabolisches Syndrom in Versuchstieren abzubilden, nachgewiesen werden. Neben einem erhöhten Fettanteil von etwa 15 Gewichtsprozenten, wobei die Fettsäuren 18:0 und 18:1 in einem Verhältnis von 1:1,7 enthalten sind, beinhaltet die AD als inflammatorische Komponente 0,5% Cholat und 1,25% Cholesterin. Die vollständige Zusammensetzung kann in Tabelle 7 eingesehen werden.

In diesem Experiment griffen wir auf Variationen der konventionellen atherogenen Diät nach Paigen zurück, welche vom Hersteller ssniff (Soest, Deutschland) speziell nach den gewünschten Vorgaben zusammengestellt wurden, um den Einfluss der Fettkomponente auf die Inflammation und metabolischen Veränderungen zu untersuchen. Dazu erhielt jeweils eine Gruppe von fünf Versuchstieren eine von sechs Varianten beziehungsweise eine der beiden Kontrollen.

4.2.1 Original AD

Gruppe eins erhielt als Kontrolle die originale atherogene Diät nach Paigen. Diese besteht zu 75% aus der ursprünglichen Diät PMI 5015 mit den Fettquellen 0,68% Sojaöl, 6,15% Schmalz und 7,5% Kakaobutter, sowie als zusätzliche Fette 7,5% Kakaobutter, 1,25% Cholesterin, 0,5% Natriumcholat und 0,125% Cholinchlorid. Es wird somit eine Gesamtfettmenge von approximativ 17 Gewichtsprozenten erzielt. Des Weiteren beinhaltet diese spezielle Hochfettdiät 7,5% Casein, jeweils 1,0% eines Vitamin Prämixes und Spurenelementen sowie als Kohlenhydratkomponente eine Mischung aus 1,625% Dextrose/Glucose, 1,625% Rohrzucker, 1,625% Maltodextrin und 1,25% Cellulose (vgl. Tabelle 7).

4.2.2 AD mit Olivenöl

Für die erste Diätvariante ersetzte der Hersteller die Grundlage der PMI 5015, so dass diese einen Anteil von 6,825% Olivenöl enthält, das natürlich reich an einfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem 18:1, ist. Eine Mischung aus 75% der modifizierten PMI 5015 mit 7,5% Olivenöl und den restlichen Bestandteilen ergibt eine Gesamtmenge von 14,325% Olivenöl sowie eine Erhöhung auf 17,1% Gesamtfett. Bis auf einen erhöhten Anteil an Cellulose in Höhe von 1,625% anstatt 1,25% entspricht diese Diät ansonsten dem Original (vgl. Tabelle 8).

4.2.3 AD ohne Cholesterol

Die zweite Variante hebt sich durch den Austausch der 1,25% Cholesterol durch die identische Menge an Maisstärke sowie durch den bereits beschriebenen erhöhten Anteil an Cellulose von der originalen Komposition hervor. Daraus resultierend reduziert sich die gesamte Fettmenge (vgl. Tabelle 8).

4.2.4 AD ohne Cholat

In Variante drei wurde der Natriumcholat-Anteil eliminiert und durch 0,5% Maisstärke ersetzt. Wiederum besteht ein erhöhter Cellulose Anteil und eine reduzierte Gesamtfettmenge (vgl. Tabelle 8).

4.2.5 AD ohne Cholin

Analog zu den beiden vorherigen Variationen besitzt die vierte Diätkomposition anstatt eines 0,125% Anteils an Cholinchlorid einen Maisstärke-Ersatz in der identischen Menge sowie den erhöhten Cellulose-Anteil (vgl. Tabelle 8).

4.2.6 AD mit Kokosfett

Die fünfte Variante der atherogenen Diät nach Paigen besitzt analog zur Variante eins eine modifizierte PMI 5015 Grundlage, in der 6,825% Kokosnussfett enthalten sind. Diese Fettquelle enthält vor allem kurzkettige, gesättigte Fettsäuren im Bereich von 12:0 bis 14:0. Eine Komposition mit zusätzlich 7,5% Fett aus Kokosnüssen sowie den restlichen Bestandteilen ergibt einen totalen Kokosnussfettanteil von 14,385% sowie einen erhöhten Gesamtfettanteil in Höhe von 17,1 Gewichtsprozenten. Wie in jeder bisherigen Diätvariante enthält auch diese Variante mehr Cellulose als das Original. (vgl. Tabelle 8)

4.2.7 Standarddiät

Als zweite Kontrolle erhielten die Tiere das Futter „ssniff R/M-H“, Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen. Dieses Futter wurde aus Getreide, Getreidenebenprodukten, Ölsaatenprodukten, Mineralstoffen, pflanzlichen Ölen, Vitaminen und Spurenelemente für Tiere im Erhaltungsstoffwechsel konzipiert, eignet sich aber auch durch die ausgewogenen Nährstoffkonzentrationen bei mittlerer Energiedichte und niedrigem Nitrosamin-Gehalt als Basisdiät bei Langzeitstudien. Die umsetzbare Energie dieser Diät setzt sich zu 58% aus Kohlehydraten, 33% aus Proteinen und nur 9% aus Fett zusammen. Somit ist diese Kontrolle das fettärmste Futter. Eine genaue Darstellung der Inhaltsstoffe kann in Tabelle 9 eingesehen werden.

4.2.8 Vergleich der Diäten

Resultierend aus den unterschiedlichen Quellen des Fettanteils, besitzen die einzelnen Diätvarianten und Kontrollen eine individuelle Fettsäurezusammensetzung. So ist es nicht verwunderlich, dass die prozentualen Anteile einiger Fettsäuren erheblich von der originalen Zusammenstellung der atherogenen Diät nach Paigen variieren. Zur Übersicht der einzelnen Fettsäureanteile der Paigen-Diät und der Variationen zeigt Tabelle 10 eine Zusammenfassung, die daneben im Diagramm (vgl. Abb. 4) veranschaulicht wird. Die Diagramme 5-8 demonstrieren die daraus resultierenden Verschiebungen der Fettsäureklassen, namentlich die gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigten Fettsäuren und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, in den einzelnen Diäten.

Tabelle 7

Darstellung der Inhaltsstoffe der originalen Paigendiät

Inhaltsstoff	Gehalt
PMI 5015 [%] ⁱ	75,000
Kasein [%]	7,500
Dextrose, Glukose [%]	1,625
Saccherose [%]	1,625
Maltodextrin [%]	1,625
Zellulose [%]	1,250
Vitaminprämix, AIN [%]	1,000
Mineralien und Spurenelemente, AIN [%]	1,000
Cholesterol [%]	1,250
Natriumcholat [%]	0,500
Cholinchlorid [%]	0,125
Kakaobutter [%]	7,500
Rohprotein [%]	19,400
Rohfett [%]	15,900
Rohfaser [%]	3,700
Rohasche [%]	5,200
Stärke [%]	27,700
Zucker [%]	7,100
Stickstofffreie Extrakte [%]	46,500
Vitamin A [IU/kg]	17,500
Vitamin D3 [IU/kg]	3,200
Vitamin E [mg/kg]	110
Cholinchlorid [IU/kg]	2,330
Kurz-/mittelkettige gesättigte Fettsäuren [%]	0,120
C 10:0 [%]	0,010
C 12:0 [%]	0,010
C 14:0 [%]	0,100
Langkettige gesättigte Fettsäuren [%]	7,180
C 16:0 [%]	3,630
C 18:0 [%]	3,470
C 20:0 [%]	0,080
Einfach ungesättigte Fettsäuren [%]	5,610
C 16:1 [%]	0,220
C 18:1 (ω 9) [%]	5,390
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]	2,270
C 18:2 (ω 6) [%]	1,960
C 18:3 (ω 3) [%]	0,210
C 20:4 (ω 9) [%]	0,100
Cholesterol [mg/kg]	12,550
GE ⁱⁱ [MJ/kg]	19,8
ME ⁱⁱⁱ (Schwein) [MJ/kg]	16,4
ME (Atwater) [MJ/kg]	17,0
Protein [%]	19,000
Fett [%]	35,000
Kohlenhydrate [%]	46,000

ⁱ PMI 5015 der originalen Paigendiät, enthält approximativ 0,68% Sojaöl, 6,15% Schweineschmalz und 7,5% Kakaobutterⁱⁱ GE (gross energy): Bruttoenergieⁱⁱⁱ ME (metabolizable energy): Metabolisierbare Energie

Tabelle 8

Zusammensetzung der Variationen der Paigendiät. Diese Tabelle zeigt die Unterschiede zur originalen Paigendiät (siehe Tabelle 7) auf.

Inhaltstoff	Original AD	AD mit Olivenöl	AD ohne Cholesterin	AD ohne Cholat	AD ohne Cholin	AD mit Kokosfett
PMI 5015 [%] ^{iv}	75,000	-	75,000	75,000	-	-
PMI 5015, Olivenöl [%] ^v	-	75,000	-	-	-	-
PMI 5015 ohne Choline [%]	-	-	-	-	75,000	-
PMI 5015, Kokosfett [%] ^{vi}	-	-	-	-	-	75,000
Maisstärke [%]	-	-	1,250	0,500	0,125	-
Zellulose [%]	1,250	1,625	1,625	1,625	1,625	1,625
Cholesterol [%]	1,250	1,250	-	1,250	1,250	1,250
Natriumcholat [%]	0,500	0,500	0,500	-	0,500	0,500
Cholinchlorid [%]	0,125	0,125	0,125	0,125	-	0,125
Olivenöl [%]	-	7,500	-	-	-	-
Kokosnussöl [%]	-	-	-	-	-	7,500
Kakaobutter [%]	7,500	-	7,500	7,500	7,500	-
Schweineschmalz [%]	+	-	-	-	-	-
Stärke [%]	27,700	27,700	29,000	28,200	28,000	27,700
Stickstofffreie Extrakte [%]	46,500	46,500	46,400	46,500	46,400	46,500
Cholinechlorid [IU/kg]	2.330	2.330	2.330	2.330	880	2.330
Kurz-/mittelkettige gesättigte Fettsäuren [%]	0,120	0,010	0,120	0,120	0,120	10,85
C 08:0 [%]	-	-	-	-	-	1,090
C 10:0 [%]	0,010	-	0,010	0,010	0,010	0,860
C 12:0 [%]	0,010	-	0,010	0,010	0,010	6,430
C 14:0 [%]	0,100	0,010	0,100	0,100	0,100	2,470
Langkettige gesättigte Fettsäuren [%]	7,180	2,260	7,180	7,180	7,180	1,900
C 16:0 [%]	3,630	1,780	3,630	3,630	3,630	1,470
C 18:0 [%]	3,470	0,420	3,470	3,470	3,470	0,430
C 20:0 [%]	0,080	0,060	0,080	0,080	0,080	-
Einfach ungesättigte Fettsäuren [%]	5,610	10,410	5,610	5,610	5,610	1,250
C 16:1 [%]	0,220	0,190	0,220	0,220	0,220	0,010
C 18:1 (ω9) [%]	5,390	10,220	5,390	5,390	5,390	1,240
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]	2,270	2,230	2,270	2,270	2,270	1,180
C 18:2 (ω6) [%]	1,960	2,010	1,960	1,960	1,960	1,090
C 18:3 (ω3) [%]	0,210	0,210	0,210	0,210	0,210	0,090
C 20:4 (ω9) [%]	0,100	-	0,010	0,010	0,010	-
Cholesterol [mg/kg]]	12.550	12.550	50	12.550	12.550	12.500

^{iv} PMI 5015 der originalen Paigendiät, enthält approximativ 0,68% Sojaöl, 6,15% Schweineschmalz und 7,5% Kakaobutter

^v 6,825% Olivenöl in modifizierter PMI 5015, totale Menge an Olivenöl 14,325%

^{vi} 6,825% Kokosfett in modifizierter PMI 5015, totale Menge an Kokosfett 14,325%

Tabelle 9

Darstellung der Inhaltstoffe der ssniff R/M – H Standard Nagerdiät

Inhaltstoffe	Gehalt
Rohnährstoffe [%]:	
<i>Trockenmasse</i>	87.7
<i>Rohprotein</i>	19.0
<i>Rohfett</i>	3.3
<i>Rohfaser</i>	4.9
<i>Rohasche</i>	6.4
<i>Stärke</i>	54.1
<i>Zucker</i>	36.5
<i>Stickstofffreie Extrakte</i>	4.7
Vitamine:	
<i>Vitamin A [IE/kg]</i>	15,000
<i>Vitamin D₃ [IE/kg]</i>	1,000
<i>Vitamin E [mg/kg]</i>	110
<i>Vitamin K (Menadion) [mg/kg]</i>	5
<i>Thiamin (B₁) [mg/kg]</i>	18
<i>Riboflavin (B₂) [mg/kg]</i>	23
<i>Pyridoxin (B₆) [mg/kg]</i>	21
<i>Cobalamin (B₁₂) [mg/kg]</i>	100
<i>Nicotinsäure [mg/kg]</i>	135
<i>Pantothensäure [mg/kg]</i>	43
<i>Folsäure [mg/kg]</i>	7
<i>Biotin [mg/kg]</i>	525
<i>Cholinchlorid [mg/kg]</i>	2,990
<i>Inositol [mg/kg]</i>	100
Spurenelemente [mg/kg]:	
<i>Eisen</i>	179
<i>Mangan</i>	69
<i>Zink</i>	94
<i>Kupfer</i>	16
<i>Iodid</i>	2.2
<i>Selen</i>	0,3
<i>Kobalt</i>	2,1
Mineralien [%]:	
<i>Calcium</i>	1.00
<i>Phosphor</i>	0.70
<i>Natrium</i>	0.24
<i>Magnesium</i>	0.22
<i>Kalium</i>	0.91
Aminosäuren [%]	
<i>Lysin</i>	1.00
<i>Methionin</i>	0.30
<i>Met + Cys</i>	0.65
<i>Threonin</i>	0.68
<i>Tryptophan</i>	0.25
<i>Arginin</i>	1.14
<i>Histidin</i>	0.44
<i>Valin</i>	0.88
<i>Isoleucin</i>	0.76
<i>Leucin</i>	1.30
<i>Fortsetzung</i>	

Inhaltstoffe	Gehalt
Aminosäuren [%]	0.85
<i>Phenylalanin</i>	
<i>Phe + Tyr</i>	1.43
<i>Glycin</i>	0.80
<i>Glutaminsäure</i>	3.90
<i>Asparaginsäure</i>	1.61
<i>Prolin</i>	1.25
<i>Alanin</i>	0.79
<i>Serin</i>	0.89
Kurz-/ mittelkettige gesättigte Fettsäuren [%]	
<i>C 08:0</i>	-
<i>C 10:0</i>	-
<i>C 12:0</i>	-
<i>C 14:0</i>	0.01
Langkettige gesättigte Fettsäuren [%]:	
<i>C 16:0</i>	0.47
<i>C 18:0</i>	0.08
<i>C 20:0</i>	0.01
Einfach ungesättigte Fettsäuren [%]:	
<i>C 16:1</i>	0.01
<i>C 18:1 (ω9)</i>	0.62
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]:	
<i>C 18:2 (ω6)</i>	1.80
<i>C 18:3 (ω3)</i>	0.23
<i>C 20:4 (ω9)</i>	-
Energie [MJ/kg]	
<i>GE^{vii}</i>	16.3
<i>ME^{viii} (Schwein)</i>	12.8

Tabelle 10

Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Diäten

	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	20:0	16:1	18:1	18:2	18:3	20:4
Original AD	0	0,01	0,01	0,1	3,63	3,47	0,08	0,22	5,39	1,96	0,21	0,1
AD mit Olivenöl	0	0	0	0,01	1,78	0,42	0,06	0,19	10,22	2,01	0,21	0
AD ohne Cholesterin	0	0,01	0,01	0,1	3,63	3,47	0,08	0,22	5,39	1,96	0,21	0,1
AD ohne Cholat	0	0,01	0,01	0,1	3,63	3,47	0,08	0,22	5,39	1,96	0,21	0,1
AD ohne Cholin	0	0,01	0,01	0,1	3,63	3,47	0,08	0,22	5,39	1,96	0,21	0,1
AD mit Kokosfett	1,09	0,86	6,43	2,47	1,47	0,42	0	0,01	1,24	1,09	0,09	0
R/M-H	0	0	0	0,01	0,47	0,08	0,01	0,01	0,62	1,80	0,23	0

^{vii} GE (gross energy): Bruttoenergie^{viii} ME (metabolizable energy): metabolisierbare Energie

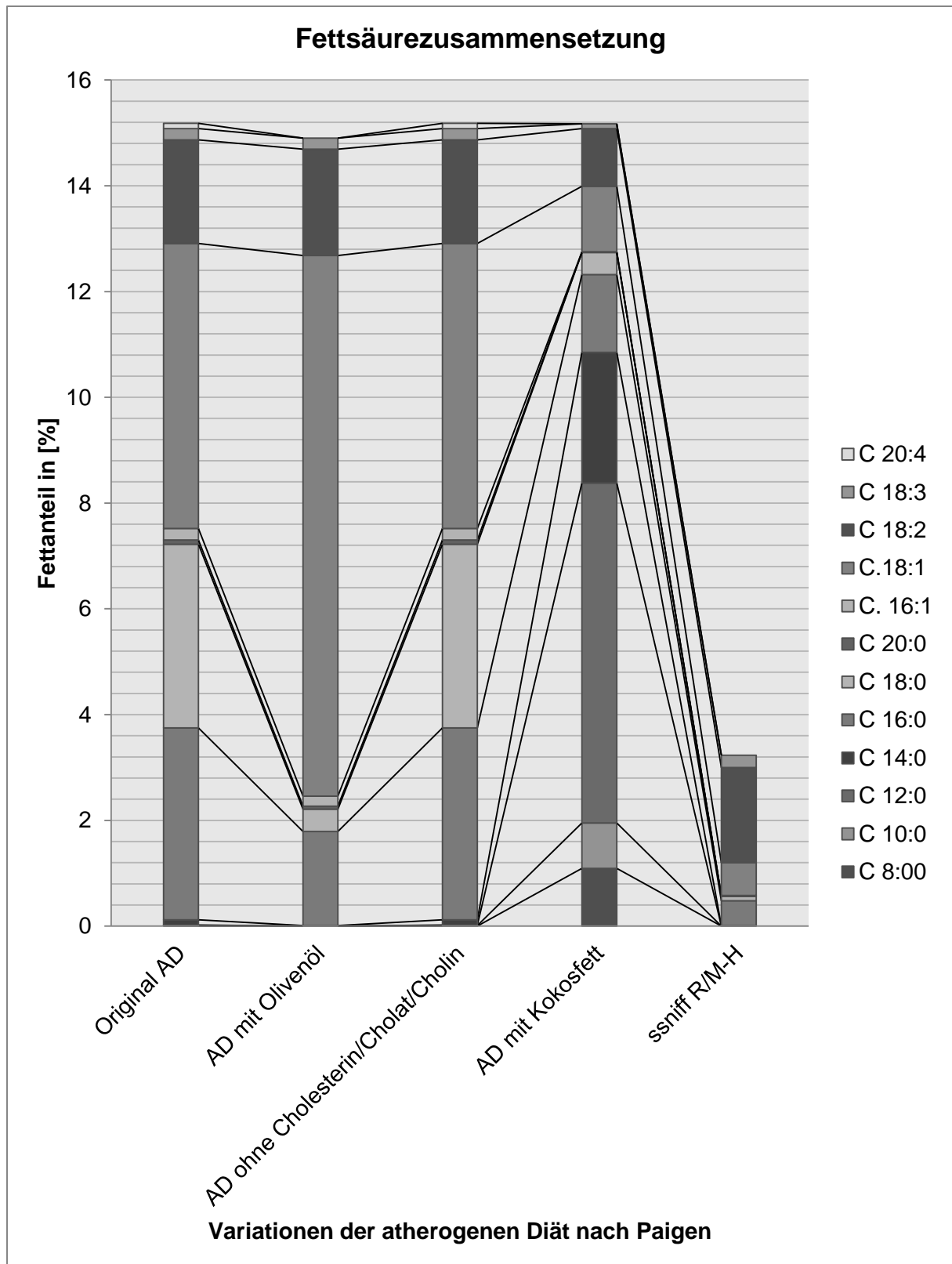


Abbildung 4:

Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Diäten im Vergleich zu den beiden Kontrollen in Prozent

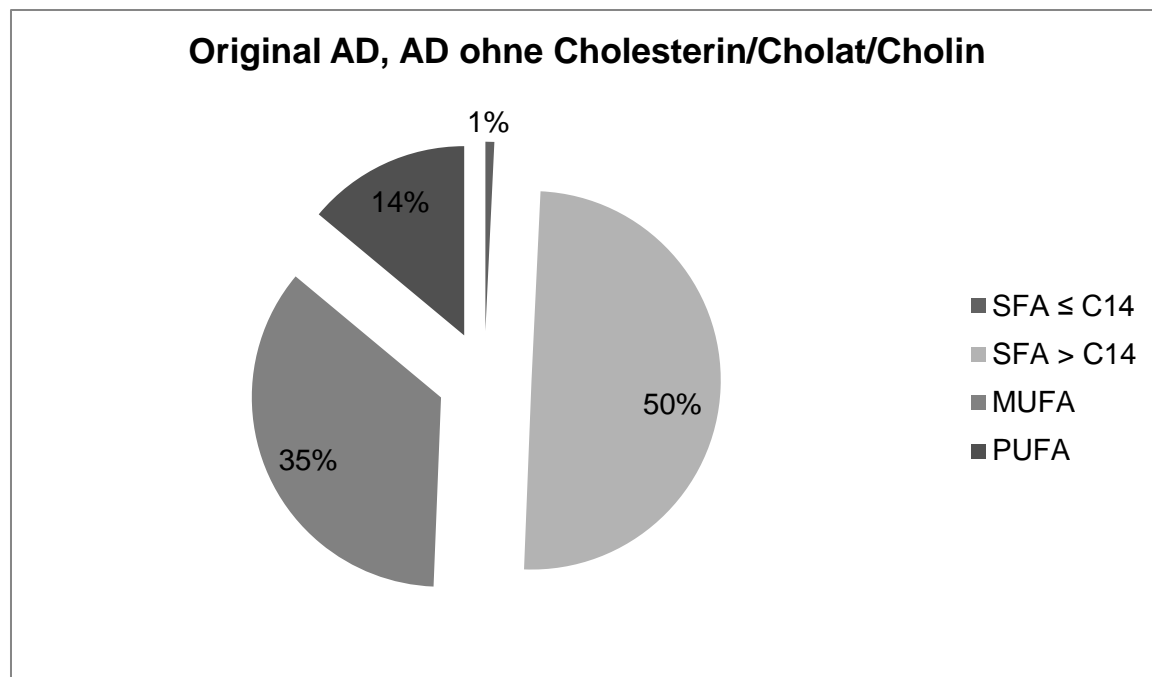


Abbildung 5:

Darstellung der einzelnen Fettsäureklassen der Original Paigen Diät sowie der Varianten 2-4 in Prozent

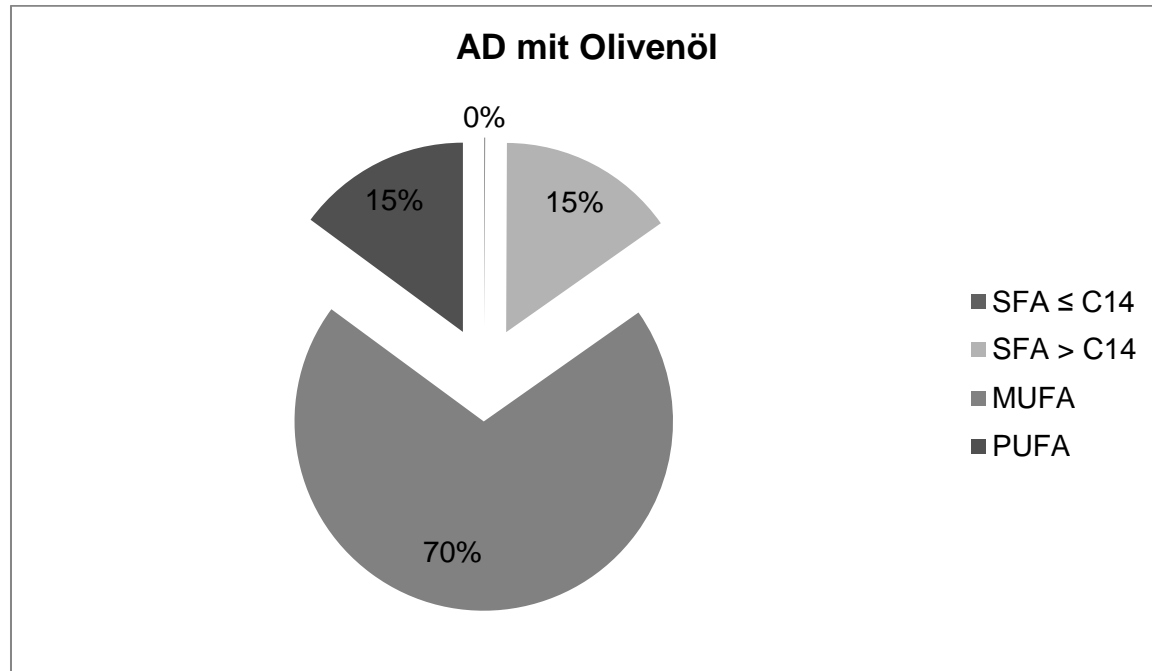


Abbildung 6:

Darstellung der einzelnen Fettsäureklassen der Variante 1 in Prozent

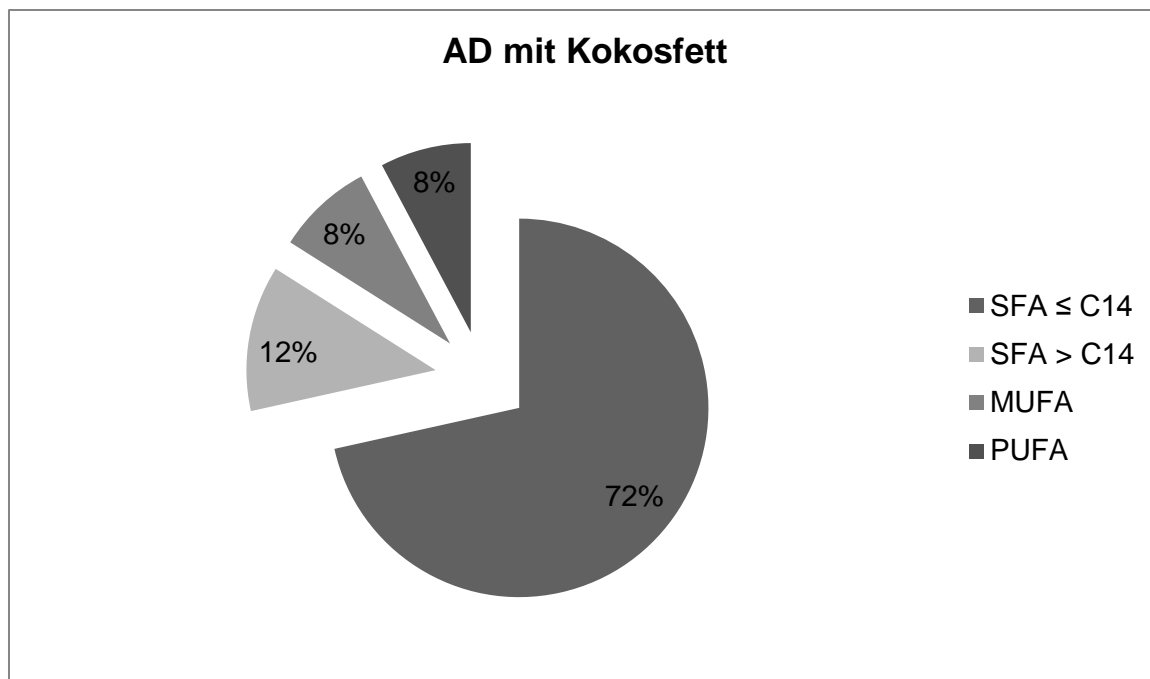


Abbildung 7:

Darstellung der einzelnen Fettsäureklassen der Varianten 5 in Prozent

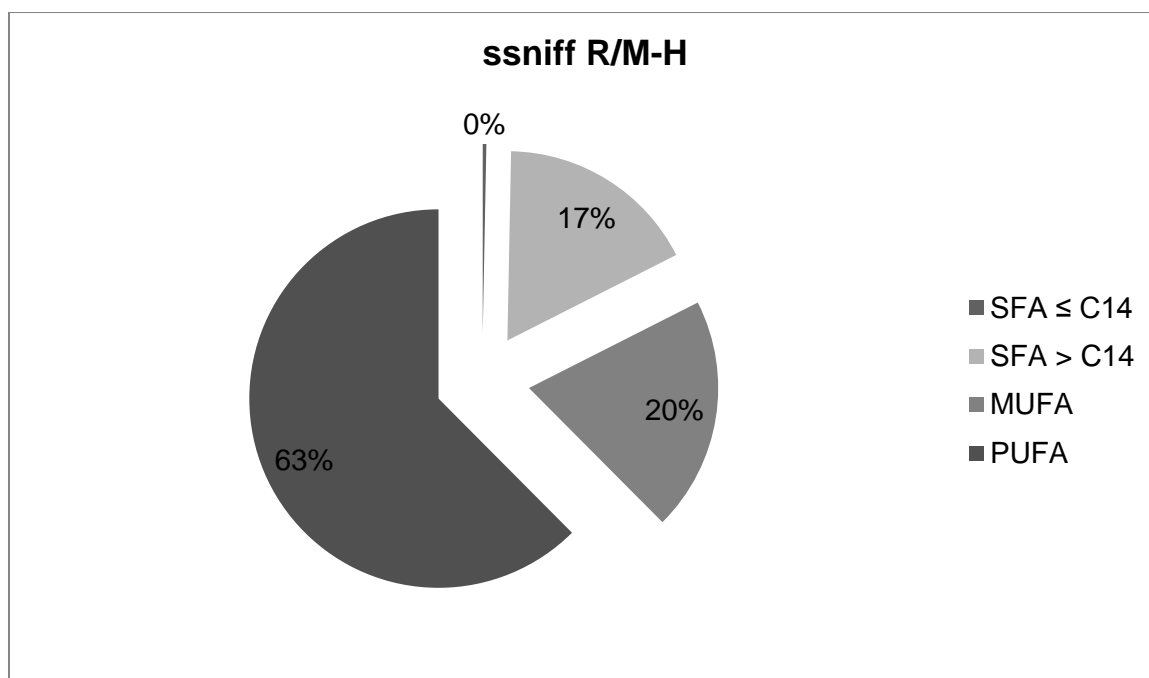


Abbildung 8:

Darstellung der einzelnen Fettsäureklassen der Standard Nagerfutter Kontrolle (ssniff R/M-H)

4.3 Material

4.3.1 Allgemeine Laborausüstung

Tabelle 11

Auflistung der allgemeinen Laborausüstung nach Kategorie, Produktname und Hersteller

Kategorie	Produkt	Hersteller
Bluttröhrchen	Monovette® 4 ml EDTA K	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Messzylinder	Plastibrand® Messbecher, div. Volumen	Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)
Metallformen	TurbOflow™ Metal Base Molds	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Organbehälter	Rotilabo Kassetten Art. E479.1	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Probenbehälter:	Tubes 1,5 ml Spitzboden Reaktionsgefäße 0,5 ml und 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Sicherheitsbehälter:	Rötzmeier Sicherheitsstandgefäße 5l	Rötzmeier Sicherheitsbehälter OHG (Salzkotten-Holsen, Deutschland)
Präparationsbesteck:	chirurgische Schere, anatomische Pinzette	Aesculap AG (Tuttlingen, Deutschland)
Stechhilfe:	Safety-Multifly®-Set	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
8-Kanal Pipette:	eppendorf Research Pipette 300 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Einkanalphetten:	eppendorf Research Pipetten 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen:	Einwegpipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt AG & Co, (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser:	24 x 40 mm Deckgläser	Superior Marienfeld Glassware - Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Objektträger:	Menzel-Gläser Super Frost® Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Saugpapier:	Kleenex®	Kimberly-Clark Corporation (Dallas, USA)

4.3.2 Geräte

Tabelle 12

Alphabetische Auflistung der bei diesem Experiment benötigten Geräte

Kategorie	Produkt	Hersteller
Abzugssystem	mc6 – Das Laborsystem	Waldner Laboreinrichtungen, (Wangen, Deutschland)
Analysewaage	Sartorius BP221S	Data Weight Systems, (Elk Grove, USA)
Brutschrank	Typ T6120	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Blutzucker - Messgerät	ACCU-CHEK Sensor Comfort	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Blutzucker - Teststreifen	ACCU-CHEK Sensor Comfort Pro	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Elektrophorese Kammer	Wide Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
ELISA-Reader	E max precision microplate reader	Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, USA)
Gefrierschrank (- 80 °C)	HERAFREEZE	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Gießstand	-	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Gewebeeinbettautomat	Shandon Hypercenter XP	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlplatte	EG 1130	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
LightCycler	Light Cycler®	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Mikroskop	DFC 290	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Paraffinausgießstation	Shandon Histocentre 2	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Schneidegerät	RM 2145 Microtome	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Schneidemesser	819 Microtome Blades	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Schüttelinkubator	Stuart Scientific S150 Orbital Incubator	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Spannungsquelle	Consort Electrophoresis Power Supply E835	Sigma-Aldrich Chemie GmbH St.Louis, USA)
Spektrophometer	NanoDrop ND – 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Thermo Cycler	PTC 100™	MJ Research, Inc. (Düsseldorf, Deutschland)
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415 D Centrifuge 5424 D Biofuge pico	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Haereus (Hanau, Deutschland)
Fortsetzung		

Kategorie	Produkt	Hersteller
UV-Lampe	TFX 20M	MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)
Vortexgeräte	Vortex VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
	REAX 1 D R	Heidolph Instruments GmbH & Co KG (Schwabach, Deutschland)
Waage	Sartorius LP 2000 S	Data Weight Systems (Elk Grove, USA)
Wasserbad	HI 1210	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)

4.3.3 Chemikalien

Verwendete Reagenzien beziehungsweise Chemikalien wurden in höchstmöglicher Qualität sowie Reinheit bezogen (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13

Auflistung der verwendeten Chemikalien nach Hersteller

Hersteller	Produkte
Sigma Aldrich GmbH (St. Louis, USA)	4,0% Formalin Fixierlösung Tissue Embedding Medium Paraplast® Regular Technisches Xylol Technisches Ethanol Eindeckmedium Eukitt® Eisessig 0,5 M EDTA mit pH 8,0 Bromphenolblau Xylencyanol
Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)	Hämalaunlösung, sauer nach Mayer Eosin G – Lösung 0,5% wässrig
Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland)	SeaKem® Agarose LE 2,0%
Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Tris Base Glycerin 87% Ethidiumbromid
Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)	1 kb Ladder 123 bp Ladder

Alle nicht erwähnten Chemikalien waren entweder Teil eines der in Ziffer 4.3.4 und 4.3.5 beschriebenen Kits oder wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

4.3.4 ELISA-Assay Kits

Um die korrekte Durchführung der verschiedenen quantitativen Nachweise von Leptin, Adiponektin, Insulin und der Triglyzeride, aus dem Plasma beziehungsweise dem Lebergewebe, zu garantieren, wurden spezielle Kits verwendet.

Tabelle 14

Auflistung der verwendeten ELISA Kits

Kit	Inhalt	Hersteller
Mouse/Rat Adiponectin ELISA Kit UM-100201	Waschlösung, 25-fach konzentriert Probenverdünnungsmittel, 5-fach konzentriert 96-Well-Microtiterplatte mit primären Antikörper beschichtet Adiponectin Standard aus rekombinanten Maus-Adiponektin, Konzentration: 8,0 ng/mL Biotinylated secondary antibody solution HRP-konjugiertes Streptavidin Streptavidin-Lösungsmittel Substrat A und B Stopplösung Plattenversiegelungen	B-Bridge International, Inc. (Cupertino, USA)
Rat Insulin ELISA – Enzym immunoassay 10-1124-01	Mit monoklonalen Anti-Insulin Maus-Ak beschichtete 96-Well-Microtiterplatte Standards (Calibrators 0-5) mit unterschiedlichen Konzentrationen Enzymkonjugat: Peroxidase-gebundene monoklonale Antiinsulin Maus-Ak, 11-fach konzentriert Enzymkonjugat Puffer Waschpuffer, 21-fach konzentriert Substrat TMB Stopplösung mit 0,5 M Schwefelsäure	Mercodia AB (Uppsala, Schweden)
Enzymimmunoassay für quantitative Bestimmung von Maus- und Ratten-Leptin E06	96-Well-Platte mit Anti-Maus/Ratten-Leptin-Ak Beschichtung Standards A-G, lyophilisiert: rekombinantes Maus-Leptin. Kontrolle KS, Antikörperkonjugat AK, 100-fach konzentriert: biotinyliertes Anti-Maus-/Rat-Leptin Antiserum Enzymkonjugat EK, 100-fach konzentriert: POD-markiertes Streptavidin. 1:100 Verdünnungspuffer VP, gebrauchsfertig Waschpuffer WP, 20-fach konzentriert TMB-Substrat Lösung S, gebrauchsfertig Stopplösung, 0,4 N Schwefelsäure Abdeckfolien für Mikrotiterplatten	Mediagnost (Reutlingen, Deutschland)

Fortsetzung

Kit	Inhalt	Hersteller
cobas® TG Triglycerides GPO- PAP	TG-Reagenz R1 bestehend aus: PIPES-Puffer (Piperazin-N,N' - Bis(2 - Ethansulfonsäure) 50 mmol/L, pH 6,8 Mg ²⁺ : 40 mmol/L Natriumcholat: 0,20 mmol/L ATP: ≥ 1,4 mmol/L 4-Aminophenazon: ≥ 0,13 mmol/L 4-Chlorophenol: 4,7 mmol/L Kaliumhexacyanoferrat(II): 1 µmol/L Fettiger Alkoholpolyglykolyäther 0,65% Lipoproteinlipase (Pseudomonas spec.) ≥ 0,5 U/mol Glycerolkinase (Bacillus stearothermophilus) ≥ 0,19 U/mL Glycerolphosphat-Oxidase (E. coli) ≥ 2,5 U/ml HRP: ≥ 0,10 U/ml	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

4.3.5 Verwendete Kits für die mRNA-Expressionsanalyse

Die Amplifikation der RNA aus dem Lebergewebe erfolgte mithilfe mehrerer Kits (siehe Tabelle 16) sowie der Primer Col1a1 links und rechts beziehungsweise TNF-alpha links und rechts. Die Primer wurden von Metabion international AG (Martinsried, Deutschland) in höchst möglicher Reinheit und Qualität geliefert. Weitere Informationen können in Tabelle 15 eingesehen werden.

Tabelle 15

Auflistung der verwendeten Primer mit Schmelztemperatur und Basensequenz

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur
Col1a1 li	5'-AAG AGG CGA GAG AGG TTT CC-3'	59°C
Col1a1 re	5'-AGA ACC ATC AGC ACC TTT GG-3'	59°C
TNF-alpha li	5'-GTC GTA GCA AAC CAC CAA GC-3'	60°C
TNF-alpha re	5'-TGT GGG TGA GGA GCA CAT AG-3'	60°C

Tabelle 16

Auflistung der einzelnen Kits zur mRNA-Expressionsmessung nach Name, Inhalt und Hersteller

Kit	Inhalt	Hersteller
Reverse Transcription System für Thermocycler PCR	AMV Reverse Transcriptase, High Concentrate (0,1 M Kaliumphosphat [pH 7,2], 0,2% Triton-X®-100, 2 mM DTT und 50% Glycerol) Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor Oligo(dT) Primer (0,5 mg/ml in H ₂ O) Random Primers (0,5 mg/ml in H ₂ O) 1.2 Kb Positive Control RNA (0,5 mg/ml in H ₂ O) 10 mM dNTP Mix (10 mM each of 4 dNTPs in H ₂ O, neutralized to pH 7,0) Reverse Transcription 10X Buffer (100mM Tris-HCl, [pH 8,8] at 25°C; 500 mM KCl, 1% Triton-X®-100) 25 mM MgCl ₂ Nuclease free Water	Promega Corporation, (Madison, USA)
MinElute® Gel Extraction Kit	MinElute Spin Columns Buffer QG Buffer PE (concentrate) Buffer EB Collection Tubes (2,0 ml) Loading Dye	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande/ Hilden, Deutschland)
RNeasy® Mini Kit	RNeasy Mini Spin Columns Collection Tubes (1,5 ml und 2,0 ml) Buffer RLT Buffer RW1 Buffer RPE (concentrate) RNase-Free Water	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande/ Hilden, Deutschland)
LightCycler® RT – PCR Kit: FastStart DNA Master SYBR Green I	1a “LightCycler® FastStart Enzyme” und 1b “LightCycler® FastStart Reaction Mix SBXR Green I, 10x conc.”: FastStart Taq DNA Polymerase dNTP Mix (dUTP anstatt dTTP) SYBR Green dye 10 mM MgCl ₂ 25 mM MgCl ₂ Stammlösung H ₂ O, PCR Grade	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)

4.3 Hard- und Software

Für die Erfassung und Dokumentation der Daten aus den ELISA Experimenten wurde die mitgelieferte Software des ELISA Reader Herstellers benutzt, Softmix V.2.34, 1993, von Dale Quantz (Molecular Devices Corp., Sunnyvale). Zur Durchführung und Dokumentation des LightCycler® Experiments kam die LightCycler® Software Version 3.5 von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) zur Anwendung.

Zur endgültigen Dokumentation, Analyse und graphischen Darstellung der anfallenden Daten aus den oben genannten Experimenten sowie der anderen Messungen fanden die Programme Excel und Word des Microsoft Office 2010 Softwarepaketes der Microsoft Corporation (Redmond, USA) Verwendung. Um die Hypothesen dieser Arbeit zu beantworten, erfolgte die statistische Auswertung der gewonnenen Daten mit SPSS 17.0 der SPSS Inc. (Chicago, USA).

4.4 Studienbeschreibung

Ziel dieser Arbeit war es, ein möglichst genaues Abbild der menschlichen nicht-alkoholischen Steatohepatitis in Ratten hervorzurufen. Zu diesem Zweck entschieden wir uns, die Auswirkung von verschiedenen Fettkomponenten auf das Auftreten, die Intensität und das histologische Bild dieser metabolischen Erkrankung zu untersuchen.

An diesem Experiment (vgl. Tabelle 17) nahmen insgesamt 35 Versuchstiere, sechs bis acht Wochen alte Wistar-Ratten aus der Züchtung von Charles River (Sulzfeld, Deutschland), aufgeteilt in sieben Gruppen teil. Diese Tiere erhielten acht Wochen lang unter den Bedingungen einer normalen, nicht-sterilen Käfighaltung ad libitum jeweils ausschließlich eine von sechs Variationen der atherogenen Diät nach Paigen. Diese bereitete der Hersteller ssniff (Soest, Deutschland) nach unseren Vorgaben zu. In diesem Versuch wurde der Ursprung der Fettkomponente durch den jeweiligen Einsatz von Olivenöl oder Kokosnussfett verändert. Dadurch unterscheidet sich die Zusammensetzung der Fettsäuren erheblich von der ursprünglichen Diätkomposition. Zusätzlich untersuchten wir die Auswirkungen durch das Fehlen beziehungsweise das Reduzieren der Cholesterin- bzw. Cholatzusätze auf die metabolische Erkrankung. Als Kontrolle diente eine siebte Gruppe von Tieren unter einer Standard-Nagerdiät.

Tabelle 17

Auflistung der Gruppeneinteilung für die einzelnen Diäten

Gruppe	Inhalt
1	Kontrolle mit AD Original
2	AD ohne Cholesterin
3	AD ohne Natriumcholat
4	AD ohne Cholinchlorid
5	AD mit Olivenöl
6	AD mit Kokosnussöl
7	Kontrolle mit Standard-Nagerdiät

Die Erfassung des Gewichts der Wistar-Ratten vor Versuchsbeginn erfolgte unmittelbar nach der Lieferung im Tierstall des Versuchslabors. Um die Gewichtszunahme und somit die Entwicklung der Tiere zu protokollieren, wurden einmal pro Woche Kontrollen des Gewichts sowie des Futtermittelsverbrauchs innerhalb von 24 Stunden durchgeführt. Am Ende der Mast, noch vor der Tötung, dokumentierten wir mit einer Blutentnahme am Rattenschwanz das Blutzuckerprofil der Versuchstiere. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Tiere mit CO₂ aus der Laborversorgung getötet und ihr erreichtes Endgewicht festgehalten. Nach Eintreten des Todes wurden die Bauchdecke und der Brustkorb der Ratte geöffnet. Dabei erfolgte die Entnahme von Proben eines Leberlappens sowie von Herzblut zu weiteren Analysen. Nach der Präparation erfolgte die ordnungsgemäße Entsorgung der Tierkadaver.

Das gewonnene Schwanzblut musste augenblicklich für eine Blutzuckermessung verwendet werden, um Störungen des Glukosestoffwechsels der Versuchstiere feststellen zu können. Für weitere Untersuchungen eignete sich jedoch ebenfalls entnommenes Herzblut besser. Mit den jeweiligen ELISA-Assays konnten die quantitativen Analysen der Plasmaspiegel von Leptin, Adiponektin, Insulin und der Triglyzeride durchgeführt werden. Diese Parameter erlauben eine differenzierte Einschätzung der Stoffwechsellage und des Hormonhaushalts der Versuchstiere.

Von den Leberbiopsien konnten histologische Schnitte mit HE-Färbung angefertigt werden, die von einem unabhängigen Untersucher auf das Vorliegen einer Steatose sowie nach Zeichen von Fibrosierung und Inflammation mikroskopisch beurteilt wurden. Des Weiteren zeigte ein ELISA Assay den hepatischen Triglyzeridgehalt quantitativ auf. Im Lebergewebe wurde auch die RNA-Expression von TNF- α und Kollagen Typ I α 1, welche bedeutende Inflamations- und Fibrosemarker sind, mit einem LightCycler® Experiment gemessen. Diese Tests ließen die Formulierung eines sowohl mikroskopischen, als auch molekularen Profils zu, anhand dessen das Vorliegen einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis in den Versuchstieren diagnostiziert werden konnte.

4.5 Methoden

4.5.1 Gewichtskontrollen

Die Tiere wurden zu Beginn des Experiments und anschließend einmal wöchentlich gewogen. Schließlich erfolgte die Registrierung des erreichten Endgewichts post mortem nach acht Wochen Fütterung. Hierzu musste die Ratte samt Schwanz mittig auf der Waage platziert werden. Dann musste abgewartet werden bis ein konstanter Wert angezeigt wurde.

4.5.2 Blutzuckermessung

Das am noch lebenden Tier entnommene Schwanzblut diente zur Messung des Blutzuckers. Hierfür erzeugte eine Stechhilfe am Schwanz der Ratte eine minimale Blutung, die durch leichtes Drücken verstärkt wurde. Der erste Tropfen musste verworfen werden, um eine Verfälschung beziehungsweise Verunreinigung zu vermeiden. Die folgenden Tropfen konnten für drei Messungen pro Ratte benutzt werden. Aus den drei Blutzuckerwerten pro Ratte errechnete sich der Mittelwert.

4.5.3 Mouse/Rat Adiponectin ELISA Kit

4.5.3.1 Prinzip

Das Adiponektin der Probe (vgl. Abb. 9) bindet an den immobilisierten ersten Antikörper der Mikrotiterplatte (Reaktion 1). Nach Ablauf der Inkubation und des Waschdurchgangs reagiert der Biotinylated secondary rabbit anti-mouse adiponectin polyclonal antibody mit dem in Reaktion 1 eingefangenen Adiponektin (Reaktion 2). Das Konjugat von Horseradish peroxidase (HRP) und Streptavidin erkennt nach dem Waschen den sekundären Antikörper (Reaktion 3), der in Reaktion 2 gebunden wurde. Ein letzter Waschvorgang entfernt überschüssige Reagenzien. Hierauf wird das colometrische Substrat für die enzymatische Farb-reaktion hinzugegeben. Die Stopplösung beendet diesen Vorgang. Die Farbintensität und somit die Adiponektinkonzentration der Probe wird durch Photometrie bei 450 nm Wellenlänge gemessen¹³³.

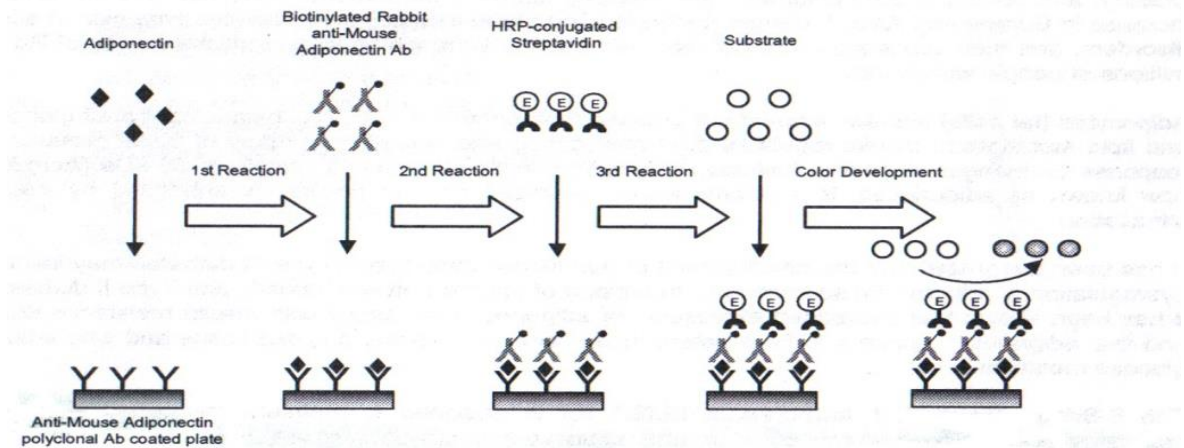
Figure 1. Assay Principle

Abbildung 9:

Schematische Übersicht des Wirkprinzips des Adiponektin Assays (Quelle: B-Bridge International, 2002)

4.5.3.2 Durchführung

Zunächst glichen sich die mitgelieferten Reagenzien der Raumtemperatur an. Die Verdünnung von 40 ml Waschlösungskonzentrat mit 960 ml destilliertem Wasser ergab die einfache Waschlösung. Daneben entsteht das einfache Verdünnungsmittel durch die Verdünnung von 50 ml Probenverdünnungsmittelkonzentrat mit 200 ml destilliertem Wasser. Durch fortlaufende Verdünnung der Adiponektin Standardlösung mit dem einfachen Probenverdünnungsmittel wurde die Adiponektin Standardreihe von 4,0 – 2,0 – 1,0 – 0,5 – 0,25 ng/ml erstellt. Des Weiteren wurden 0,6 µl HRP-konjugiertes Streptavidin mit 12 ml Streptavidin Lösungsmittel gemischt. Schließlich erfolgte die Herstellung der Substratlösung durch Vermischen von Substrat A und B im Verhältnis 1:1.

Zur Aufbereitung der Proben wurden diese als erstes auf Raumtemperatur erwärmt, danach 10 µl Plasma mit 1,0 ml Probenverdünnungsmittel pro Probe vermischt. Ausgehend von diesem Gemisch entsteht durch Überführung von 100 µl und 1 ml Probenverdünnungsmittel in ein neues Tube das Zielverhältnis von 1:1111. Die 96-Well-Platten wurden mit je 350 µl pro Well gewaschen und mit Saugpapier getrocknet. Der Versuch wurde mit einem doppelten Ansatz, das heißt zwei Wells pro Probe beziehungsweise Standard zu je 100 µl durchgeführt. Eine Inkubation der versiegelten Platte für 60 min bei 22-28 °C im Brutkasten ermöglichte die Reaktion 1. Nach Eliminierung der gesamten Reaktionslösung erfolgten drei Waschvorgänge nach folgendem Schema: Je 350 µl Waschlösung wurden in die Wells pipettiert und sofort wieder aspiriert. Die Applikation von je 100 µl pro Well des sekundären

Antikörpers und 60-minütiger Inkubation bei 22-28 °C der versiegelten Mikrotiterplatte initiierte die zweite Reaktion. Nach Ablauf der Zeit wurde wieder die Reaktionslösung aspiriert und eine Waschphase nach dem obigen Schema wiederholt. Für die dritte Reaktion wurden pro Well 100 µl HRP-konjugiertes Streptavidin pipettiert, die Platte versiegelt und wiederum 60 Minuten bei 22-28 °C inkubiert. Eine Wiederholung der Elimination und der Waschvorgänge verhinderte eine Verfälschung der Reaktion. Schließlich wurde die enzymatische Farbreaktion durch Ansetzen von 100 µl kolometrischer Substratlösung pro Well gestartet. Der Abbruch dieser Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl Stopplösung nach 15-minütiger Einwirkungszeit bei 22-28 °C im Inkubator. Augenblicklich analysierte der ELISA-Reader die eingelegten Platten bei 450 nm Wellenlänge. Anhand der Extinktion berechnete anschließend das integrierte Programm Softmix V.2.34 die Konzentration.

4.5.4 Rat Insulin ELISA – Enzymimmunoassay

4.5.4.1 Prinzip

Dieses ELISA Kit ist ein sogenanntes solid phase two.site enzyme immunoassay, das auf der direkten Sandwich Technik basiert. Hierbei reagieren zwei monoklonale Antikörper gegen separate Antigene auf dem Insulinmolekül. Während der Inkubation bindet das Insulin der Probe mit dem Peroxidase-gebundenen Antiinsulin-Antikörper und gleichzeitig mit dem an der Mikrotiterplatte gebundenen Antiinsulin-Antikörper. Ungebundene, enzymgebundene Antikörper werden durch einen Waschgang entfernt. Die Reaktion von gebundenem Konjugat mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wird für den Nachweis gemessen. Die Stoppreaktion findet durch Säure und der Nachweis durch Photometrie statt¹³⁴.

4.5.4.2 Durchführung

Für jede Mikrotiterplatte erfolgte die Verdünnung von 600 µl des Enzymkonjugats mit 6 ml Enzymkonjugat-Puffer 1:10. Ein kurzer Einsatz des Vortexers ermöglichte die vollständige Vermischung der beiden Reagenzien. Zudem verdünnte die Zugabe von destilliertem Wasser das Konzentrat des Waschpuffers in einem Verhältnis von 1:20. Währenddessen wärmten sich die Standards und Proben auf Raumtemperatur auf. Auch für diesen Versuch hatten wir einen doppelten Ansatz gewählt. Somit wurden die Standards 0-5 sowie die Proben zu je 25 µl pro Well mit je 50 µl Enzymkonjugat Lösung pipettiert. Dieser Ansatz musste nun zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einen Schüttler mit 700-900 upm inkubieren. Nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit wurde das Reaktionsmedium aspiriert und durch 350 µl Waschpuffer pro Well ersetzt und sofort wieder entfernt. Dieser Waschvorgang wiederholte sich sechsmal, bevor die Platten gegen ein Saugpapier gestürzt wurden. Anschließend erfolgte die Applikation von 200 µl Substrat TMB pro Well. Nach 15 Minuten Inkubation antagonisierte die Zugabe von je 50 µl Stopplösung die Reaktion. Um das vollständige

Vermischen und somit den Reaktionsstopp sicherzustellen, wurde die Platte für fünf Sekunden auf einen Schüttler platziert. Das sofortige Auslesen der 96-Well-Platten durch den ELISA Reader bei 450 nm ermöglichte der Software Softmix V.2.34 die Berechnung des Plasmainsulinspiegels anhand der Extinktion.

4.5.5 Enzymimmunoassay für quantitative Bestimmung von Maus- und Ratten-Leptin

4.5.5.1 Prinzip

Die Wells der inbegriffenen Mikrotiterplatte sind mit Anti-Maus/Ratten-Leptin-Antikörpern beschichtet. Dieser primäre Antikörper bindet und immobilisiert das Antigen auf den Leptinmolekülen der Probe. Nach Ablauf der Inkubationszeit und der Entfernung des überschüssigen Reaktionsmaterials reagiert der sekundäre biotinylierte Anti-Maus-/Ratten-Leptin-Antikörper mit dem gebundenen Leptin und wird selbst dabei eingefangen. Weitere Waschvorgänge nach Beendigung der Inkubation verhindern das Verfälschen der Reaktion. Hierauf erfolgt die dreißigminütige Reaktion mit dem Enzymkonjugat, welches POD-markiertes Streptavidin enthält. An die letzte Waschphase anschließend ermöglicht die Zugabe der TMB-Substrat-Lösung-S im Dunkeln eine enzymatische Reaktion, die durch die schwefelsäurehaltige Stopplösung abgebrochen wird. Der quantitative Nachweis erfolgt durch Photometrie¹³⁵.

4.5.5.2 Durchführung

Zur Vorbereitung der Reagenzien mussten die Konzentrate durch Verdünnungen in ihre einfache Form rekonstituiert werden. Damit die Eichkurve der Standards den Bereich zwischen 25 bis 1600 pg/ml abdeckt, wurden die Standards A bis G, die rekombinantes Maus-Leptin enthalten, mit 1 ml Verdünnungspuffer hergestellt. Die Kontrolle in Form eines Mausserums war mit 200 µl Verdünnungspuffer zu rekonstituieren, um die akzeptable Abweichung von zwei Standardabweichungen zu garantieren. Vor Gebrauch mussten die hundertfach konzentrierten Antikörper- und Enzymkonjugate mit dem Verdünnungspuffer auf ein Verhältnis von 1:100 verdünnt werden. Der für die Waschvorgänge notwendige Waschpuffer benötigte eine 1:20 Verdünnung mit dem mitgelieferten Puffer. Eine Probenverdünnung im Verhältnis 1:5, 50 µl Probe mit 200 µl Verdünnungspuffer, war Voraussetzung für diesen ELISA-Assay. Für dieses Experiment hat sich ein doppelter Ansatz mit je 100 µl pro Well als vorteilhaft erwiesen. Die Wells der Mikrotiterplatte wurden nun mit der Standardreihe A bis G, dem Leerwert, dem Kontrollserum sowie den zu untersuchenden Rattenplasmen befüllt, versiegelt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 350 upm inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit verhinderte das Absaugen der gesamten Reaktionslösung aus den Vertiefungen der 96-Well-Platte, die zusätzlich ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde, die Verfälschung der Reaktion. Jeder dieser Zyklen sollte nur 15 Sekunden

dauern. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl des Antikörpers gegeben, welcher wieder eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler einwirken musste. Hierauf folgte auf drei Waschdurchgänge die Zugabe des Enzymkonjugats mit einem Volumen von 100 µl. Dieses Gemisch musste 30 Minuten bei einer Schüttelfrequenz von 350 upm einwirken. Anschließend wurde nach der letzten Waschphase in jedes Well 100 µl TMB-Substrat-Lösung-S pipettiert. Hierauf folgte eine 30-minütige Inkubation in der Dunkelkammer. Schließlich beendete die Applikation von 100 µl Stopplösung pro Well die Farbreaktion. Die quantitative Analyse führte der ELISA-Reader zeitnah bei 450 nm mit einem Referenzfilter von 620 nm durch. Anhand der Extinktion berechnete die integrierte Software die Leptinkonzentration der Proben.

4.5.6 Triglyzeridbestimmung aus Lebergewebe und Rattenplasma

4.5.6.1 Prinzip

Triglyzeride und Wasser werden von Lipoproteinlipase in Glycerol und Fettsäuren umgesetzt. Glycerol reagiert in Anwesenheit von ATP durch die Glycerolkinase zu Glycerol-3-Phosphat. Dieses oxidiert mit Sauerstoff durch die Glycerolphosphat-Oxidase zu Dihydroxyaceton-Phosphat und Wasserstoffperoxid. Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorophenol in Anwesenheit der Peroxidase zum roten Farbstoff 4-p-Benzoquinon-Monoimino-9-Phenazon sowie zu Wasser und Salzsäure. Die Intensität des roten Farbstoffes kann photometrisch gemessen werden¹³⁶.

4.5.6.2 Durchführung

Zunächst wurden etwa 50 mg Gewebe pro Rattenleberprobe abgewogen und im flüssigen Stickstoff zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Gabe von je 1 ml eines 2:1 Chloroform/Methanol-Gemisches. Eine Inkubationszeit von einer Stunde unter Schütteln war für diese Reaktion bei Raumtemperatur notwendig. Hierauf erlangte man durch Zugabe von je 200 µl destilliertem Wasser und dem Einsatz eines Vortexers eine gute Löslichkeit. Die gut vermischten Proben wurden fünf Minuten lang bei 3000 upm zentrifugiert. Die untere Phase musste abgezogen und in ein neues Tube überführt werden, um den Überstand an der Luft trocknen zu lassen. Das hierbei entstandene Pellet musste zur weiteren Verwendung in 60 µl teritären Butanol und 40 µl eines Triton-X-114/Methanol-Gemisches mit einem 2:1 Verhältnis gelöst und einige Sekunden im Vortexer vermischt werden. Nun waren die Proben aus den Rattenlebern für die weitere Analyse vorbereitet. Die Rattenplasmen hingegen konnten ohne Vorbereitung verwendet werden.

Das cobas® TG-Assay von Roche ermöglichte die quantitative Auswertung der Leber- und Plasmaproben. Nach dem Auftauen der Standards und des TG-Reagenz des Assays wurden die Proben und der Standard zu je 2 µl/Well, sowie 200 µl TG-Reagenz in eine 96-Well-

Platte pipettiert. Der Versuch erfolgte mit doppeltem Ansatz. Außerdem benötigte die Berechnung der Konzentrationen das Ansetzen von zwei Leerwerten, die nur 200 µl des TG-Reagenz enthielten. Nach dem Vermischen der Proben verblieben diese für die Dauer von fünf Minuten bei 37 °C im Inkubator.

Nach Ablauf dieser Zeit konnten die Proben im ELISA-Reader bei 540 nm gegen das TG-Reagenz gemessen und aus der Extinktion die Konzentration berechnet werden. Als nächstes erfolgte die Berechnung des Mittelwerts aus den beiden Ansätzen pro Probe, von dem der Leerwert abgezogen werden musste. Der Quotient aus dem Mittelwert der Probe und dem Wert des Standards multipliziert mit der Sollwertkonzentration des Glycerol-Standard von 2 mg/dl ergab die Konzentration der Triglyzeride in mg/dl.

4.5.7 Anfertigung der Leberschnitte für das histologische Scoring

Nach Todeseintritt des Tieres wurden die Ratten auf den Rücken gelegt und der Bauch mit destilliertem Wasser bestrichen, um die Haare aus dem Präparationsgebiet fernzuhalten. Mit Hilfe einer chirurgischen Schere erfolgte die Eröffnung des Bauchraums sowie des Brustkorbs zur Entnahme eines kleinen Lappens der Leber, der in einer Rotilabo-Kassette aufbewahrt wurde. Darüber hinaus ermöglichte die Entnahme von Blutproben aus dem Rattenherzen mit einer Stechhilfe die oben genannten ELISA Assays (vgl. Ziffer 4.5.3 – 4.5.6). Die Pathologie im Universitätsklinikum Regensburg bereitete die Leberbiopsien für die weitere Verarbeitung wie im Folgenden beschrieben vor.

Zunächst fixierte vierprozentiges Formalin für vier bis fünf Stunden die Proben, bevor diese über Nacht in den Einbettungsautomaten gegeben wurden, der einige Schritte zur Vorbereitung der Organe durchführte (siehe Tabelle 18). Am nächsten Morgen konnten die Proben in flüssigem Paraffin bis zur Weiterverarbeitung im Brutkasten bei 70 bis 75 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 18

Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte der Paraffinierung des Lebergewebes

Chemikalie	Dauer
Formalin	90 min
Ethanol 70%	60 min
Ethanol 70%	60 min
Ethanol 96%	60 min
Ethanol 96%	60 min
Ethanol 100%	60 min
Ethanol 100%	60 min
Ethanol 100%	60 min
Xylol	60 min
Xylol	60 min
Paraffin	90 min
Paraffin	90 min

Für den Schritt der Paraffinierung musste das Organ aus der Rotilabo-Kassette entnommen, in eine Metallform gelegt und dann mit dem beschrifteten Kassettenboden bedeckt werden. Das Präparat wurde nun auf die Heizplatte unter dem Ausgussshahn platziert und mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Nach Ablauf des Überstandes härtete das flüssige Paraffin auf der Kühlplatte aus. Der entstandene Paraffinblock wurde nun aus der Metallform gelöst und von überflüssigem Material entgratet. Durch diese Aufbereitung konnten die Proben bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Die Paraffinblöcke lagen zur Verbesserung der Schnittfähigkeit auf der Kühlplatte, bevor sie in das Microtome eingespannt wurden. Das Messer löste die überflüssige Paraffinschicht ab, bis das Organ mittig angeschnitten war. Nun wurden zahlreiche Organschnitte angefertigt und ins warme Wasserbad zur Entfaltung gegeben. Aus diesen wählten wir zwei geeignete aus, die einen repräsentativen Schnitt durch alle Schichten des Organs darstellten. Diese beiden Schnitte konnten mit jeweils einem Objektträger eingefangen und getrocknet werden. Zur Steigerung der Beurteilbarkeit der Leberschnitte mussten diese mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingefärbt werden.

Zu Beginn erfolgte die Entparaffinierung des Organs durch eine absteigende Alkoholreihe (vgl. Tabelle 19). Anschließend wurden die Objektträger fünf Minuten in eine Hämalalaun-Lösung getaucht und danach mit destilliertem Wasser gespült. Eine weitere Spülung von zehn Minuten unter fließendem Wasser erzielte das Entfernen des restlichen, überflüssigen Farbstoffs. An diesen Punkt anknüpfend konnte der zweite Farbstoff, Eosin, mit ebenfalls zehnminütiger Einwirkdauer appliziert werden. Abschließend folgte noch eine weitere Alkoholreihe (vgl. Tabelle 20). Nach Beendigung dieser Prozedur erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Eukitt und einem Deckgläschen.

Tabelle 19

Auflistung der Arbeitsschritte in der ersten Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Färbung der Leberschnitte

Chemikalie	Dauer
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 90%	5 min
Ethanol 80%	5 min
Ethanol 70%	5 min
Destilliertes Wasser	5 min

Tabelle 20

Auflistung der Arbeitsschritte in der zweiten Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Färbung der Leberschnitte

Chemikalie	Dauer
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

Anschließend wurden die fertigen Schnitte an den unabhängigen Untersucher Dr. Erwin Gaebele geschickt. Dieser führte geblindet das histopathologische Scoring durch. Im Rahmen dieser Diagnostik konnte das Vorliegen einer Steatose, Inflammation oder Fibrose unabhängig beurteilt werden. Das Ergebnis wurde für jedes Versuchstier protokolliert.

4.5.8 mRNA Expressionsanalyse von TNF α und Kollagen Typ I α 1

4.5.8.1 RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebe erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Kit¹³⁷. Für dieses Experiment mussten etwa 20-30 mg Lebergewebe pro Biopsie abgewogen und in 600 μ l RLT-Puffer ca. 45 Sekunden homogenisiert werden. Das entstandene Lysat wurde mit Eis gekühlt und drei Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Überstand musste in ein neues Tube überführt werden, während die obere Fettschicht und das Pellet verworfen wurden. Im nächsten Schritt entstand mit Hilfe eines Vortexers ein Gemisch aus 600 μ l Ethanol 70% und dem Überstand. 600 μ l dieses Gemisches wurden auf die RNeasy-spin-columns gegeben, die 15 Sekunden bei 10.000 upm zentrifugiert wurden. Dieser Vorgang wiederholte sich mit dem restlichen Volumen. Hierauf erfolgte eine Zugabe von 600 μ l RW1-Puffer auf das Pellet in den RNeasy-spin-columns, welche wiederum 15 Sekunden bei 10.000 upm zentrifugiert wurden. Der Überstand musste verworfen werden. Dieselbe Prozedur wiederholte sich weitere zweimal für je 500 μ l RPE Puffer. Im letzten Durchgang verblieben die Proben zwei Minuten

lang in der Zentrifuge. Eine weitere Zentrifugation bei 13.000 upm für die Dauer von einer Minute - nach Verwerfen des letzten Überstandes - erzielte die Trocknung der Membran der RNeasy-spin-columns. Anschließend wurden die columns mit einem Hygienetuch kurz trocken getupft und in ein neues Tube eingesetzt, das mit 30-50 µl RNase-free water befüllt wurde. Nach einer Minute Inkubation wurde eine Minute bei 13.000 upm zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, musste das Eluat nochmals auf die RNeasy-spin-columns gegeben und eine Minute bei 1.300 upm zentrifugiert werden. RNA konnte nun bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Der Standard entstand als Pool-RNA, wobei von jeder RNA-Probe der Gruppe etwa 2 µl beigemischt wurden.

4.5.8.2 RNA-Konzentrationsmessung

Zunächst mussten die Proben und der Standard mit RNA-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Anschließend führte das NanoDrop-Gerät Konzentrationsmessung der Proben gegen den Leerwert (RNA-freies Wasser) durch.

4.5.8.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-chain-Reaktion

Um die mRNA aus den Proben des Lebergewebes mit dem LightCycler® analysieren zu können, musste diese erst mit der RT-PCR als korrespondierende DNA (cDNA) vervielfältigt und umgewandelt werden. Hierbei kam das Reverse Transcription System¹³⁸ zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurde aus den vorher gemessenen Ergebnissen das Volumen berechnet, das 1 µg RNA enthält. Diese Menge wurde daraufhin mit 10,5 µl nuclease free water aufgefüllt und in ein Tube pipettiert.

Das Erstellen der Standardreihe durch eine Verdünnungsreihe ermöglichte die für die Messung notwendige Eichkurve (vgl. Tabelle 21). Der Ausgangspunkt der Reihe, der RT-Ansatz, basierte auf der Mischung von 2 µg der Pool-RNA mit 40 µl Ansatz.

Tabelle 21

Auflistung der Arbeitsschritte der Verdünnungsreihe zur Herstellung des Standards

Standard	Mischung
V1	30 µl RT + 120 µl nuclease free water
V2	75 µl V1 + 75 µl nuclease free water
V3	75 µl V2 + 75 µl nuclease free water
V4	75 µl V3 + 75 µl nuclease free water
V5	75 µl V4 + 75 µl nuclease free water

Für die Herstellung des RT-Ansatzes der Proben war die Vermischung von je 9,5 µl Mastermix (vgl. Tabelle 22) und 10,5 µl RNA in einem Tube nötig, das anschließend möglichst mittig in den Thermocycler platziert wurde. Dieses Gerät durchlief ein Programm, in dem die Proben erst zehn Minuten bei Raumtemperatur, dann 15 Minuten bei 42 °C sowie fünf Minuten lang bei 95 °C und schließlich für fünf Minuten bei 0-5 °C bebrütet wurden, um das Binden der reversen Transkriptase an die cDNA zu verhindern. Nach Programmende konnten die cDNAs bei -20 °C bis zu ihrer Analyse mit dem LightCycler® gelagert werden.

Tabelle 22

Auflistung der Bestandteile des RT-Mastermix für eine Probe

Chemikalie	Volumen
25,0 mM MgCl	4.0 µl
Reverse Transcription 10x Buffer	2.0 µl
10 mM dNTP Mixture	2.0 µl
Random Primers	0,5 µl
Recombinant RNAsin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase	15 u

4.5.8.4 Primertest

Der rechte und linke Primer wurden bei Metabion (vgl. Tabelle 15) bestellt und laut Datenblatt auf 100 pmol/µl mit nuclease free water verdünnt. Hierauf erfolgte eine weitere Verdünnung im Verhältnis 1:20 der beiden Primer, um eine Konzentration von 5 pmol/µl zu erhalten. Es schloss sich ein Probedurchgang mit dem LightCycler® Gerät an, in dem die fertigen Primer und eine beliebige Probe getestet wurden. Es mussten hierbei je eine Kapillare mit cDNA einer beliebigen Probe und je eine mit Wasser gefüllt werden. Die Temperatur des Laufes wurde dem Datenblatt entnommen und wenn nötig korrigiert, bis das Gerät eine perfekte Schmelzkurve anzeigte.

Die Kapillare mit dem PCR-Produkt wurde nun mit der Öffnung nach unten in ein neues Tube gestellt und bei 3.000 upm eine Minute lang zentrifugiert. Während der Vorbereitung des Agarosegels musste das PCR-Produkt auf Eis gekühlt werden. 2 g Agarose aufgekocht mit 100 µl 1xTAE-Puffer ergab nach kurzem Abkühlen im Gießstand sowie der Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid und anschließendem leichten Rühren das Agarosegel. Nach dessen Aushärtung konnte es mit je 10 µl der Marker 1 kb-Ladder und 123 bp-Ladder sowie aus einem Gemisch von 3 µl Loading Dye und 20 µl PCR-Produkt beladen werden. Daraufhin lief das Gel 30 bis 35 Minuten bei 100 V Spannung. Unter einer UV-Lampe wurde die korrekte Lage der Bande auf dem Gel kontrolliert.

Anschließend erfolgte die Herauslösung der DNA aus der Agarose mit Hilfe des Qiagen MinElute Gel Extraktions Kit¹³⁹. Hierzu musste die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem Buffer QG aus dem Kit im Verhältnis 1:6 vermischt werden. Eine vollständige Auflösung des Gemischs garantierte eine Inkubationszeit von mindestens 10 Minuten bei 50 °C im Brutkasten sowie alle zwei bis drei Minuten die Benutzung eines Vortexers. Anschließend erfolgte die Applikation von einem Gelvolumen Isopropanol, das mit der Lösung gut vermischt werden musste. Die Probe wurde daraufhin in die Kombination aus Collection tube und MinElute Column gegeben und eine Minute bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, durch 500 µl pro Spin Column ersetzt und wiederum bei 13.000 upm eine Minute lang zentrifugiert. Nach Eliminierung des Durchflusses fand ein Waschdurchgang mit 750 µl Buffer PE mit anschließender einminütiger Zentrifugation bei 13.000 upm statt. Um die Proben zu trocknen, verblieben diese nach Verwerfen des Durchflusses ein weiteres Mal bei 13.000 upm für eine Minute in der Zentrifuge. Zur Elution der DNA-Probe musste die MinElute column in ein frisches 1,5 ml Microzentrifugentube gesteckt und das Zentrum der Membran mit 10 µl Buffer EB benetzt werden. Nach einer Minute Inkubationszeit erfolgte eine einminütige Zentrifugation der Probe bei 13.000 upm. Die gereinigte DNA befand sich nun gelöst in dem frischen Reaktionsgefäß.

4.5.8.5 Sequenzierung

Zur Erfolgskontrolle des Probedurchgangs schickten wir die DNA zur Sequenzierung an das Labor GENEART AG im Biopark der Universität Regensburg^{ix}. Hierfür verdünnten wir die im vorherigen Schritt gewonnene DNA 1:10 mit nuclease free water. 1 µl dieses Gemisches wurde mit 1 µl eines Primers, entweder rechts oder links, sowie mit 6 µl nuclease free water in einem Tube vermischt. Nach Erhalt eines positiven Kontrollergebnisses führten wir die eigentliche LightCycler® Analyse durch.

4.5.8.6 LightCycler®

Die Materialien für den Mastermix (vgl. Tabelle 23) aus dem „LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I“ Kit¹⁴⁰ kühlten auf Eis. LC-Cup 1a und b wurden kurz bei 3000 upm zentrifugiert und anschließend 10µl a in b gegeben und mit dem Vortexer vermischt. In einem LightCycler® Durchlauf wurde ein doppelter Ansatz von V1 bis V5 zu je 2 µl, der Wasser-Leerprobe und zehn Proben getestet. Nach Erstellung des Mastermixes erfolgte die Gabe von je 2 µl cDNA pro Probe zu 18 µl Mastermix. Diese Ansätze wurden dann in die Kapillaren pipettiert, versiegelt und im Karussell 15 Sekunden lang bei 3.000 upm zentrifugiert. Anschließend startete der LightCycler® unter Kontrolle der Schmelzkurve bezieh-

^{ix} GENEART AG, Franz-Engert-Str. 11 in 93051 Regensburg

ungsweise der Standardkurve. Die Konzentrationen wurden semiquantitativ anhand eines Vergleichs der experimentellen crossing points mit denen einer Standard Pool-cDNA und der dazugehörigen Konzentrationen bestimmt¹²¹.

Tabelle 23

Auflistung der Bestandteile des Mastermix pro Probe

Chemikalien	Volumen
Mix aus LC Cup 1a und 1b	2,0 µl
MgCl	2,4 µl
Primer rechts	1 µl
Primer links	1 µl
Nuclease free water	11,6 µl

4.6 Angaben zur Statistik

Die statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse aus unabhängigen Experimenten erfolgte mit Hilfe der Software SPSS®PASW Statistics. Zur Auswertung wurden der Fisher-Pitman-Permutationstest herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

Die im Folgenden präsentierten Versuchsergebnisse basieren auf je fünf Versuchstieren pro Gruppe, wobei jedes Laborexperiment mit einem doppelten Ansatz durchgeführt wurde. Die Daten wurden arithmetisch gemittelt (Mittelwert, MW) und die diesbezügliche Standardabweichung (SD) errechnet. Die statistische Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Fisher-Pitman-Permutationstests (vgl. Kapitel 4.6). Statistische Signifikanz besteht bei $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Original AD Kontrollgruppe.

5.1 Gewicht

Insgesamt 35 Versuchstiere, männliche Wistar-Ratten im Alter von sechs bis acht Wochen, waren am achtwöchigen Experiment beteiligt. Gleich nach Erhalt der Lieferung wurden die Ratten nüchtern gewogen (Messzeitpunkt 1 = MZ 1). Anschließend erfolgten nach Ablauf von jeweils sieben Tagen weitere Gewichtskontrollen, jedoch ohne der Voraussetzung der Nüchternheit (MZ 2-9). Die letzte Gewichtsmessung (MZ 10) erfolgte unmittelbar nach der Keulung des Tieres. Wegen der Blutabnahme für weitere Laborparameter waren die Tiere zu dieser Zeit nüchtern. Unabhängig davon wurde im Abstand von sieben Tagen der Futterverbrauch innerhalb von 24 Stunden pro Gruppe protokolliert und anschließend der Durchschnittsverbrauch pro Tier in der jeweiligen Gruppe ermittelt (MZ A-F).

5.1.1 Gewichtsverlauf und erreichtes Endgewicht

Der ausschließliche Genuss fettreicher Diäten führt üblicherweise zu Übergewicht und zahlreichen metabolischen Störungen wie Insulinresistenz, die zum metabolischen Syndrom zusammengefasst werden. Somit ist die Adipositas ein Schlüsselfaktor für die Entstehung der nicht-alkoholischen Fettleber sowie der Steatohepatitis (vgl. Kapitel 2.3, 2.5). Aus diesem Grund wird in diesem Experiment ein hohes Gewicht als positiv für das Vorhandensein eines metabolischen Syndroms gewertet.

Im protokollierten Gewichtsverlauf ist ersichtlich, dass sich die schwersten Tiere in der Gruppe der AD mit Kokosfett ($477,54 \pm 30,72$ g) und der Standarddiät ($477,33 \pm 36,68$ g) befanden, gefolgt von der AD ohne Cholin und der Original AD. Gruppe zwei, die die AD ohne Cholesterin erhielt, brachte die leichtesten Tiere mit $410,84 \pm 44,90$ g hervor. Diese Resultate zeigen lediglich Tendenzen, aber keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zur Original AD auf (vgl. Tabelle 24 und Abb. 10).

Tabelle 24

Auflistung des erreichten Endgewichts nach Gruppen

Diät	Gewicht [g]
Original AD	464,13 ± 24,76
AD ohne Cholesterin	410,84 ± 44,90
AD ohne Cholat	444,20 ± 31,52
AD ohne Cholin	466,25 ± 22,67
AD mit Olivenöl	455,54 ± 50,52
AD mit Kokosfett	477,54 ± 30,73
Standarddiät	477,33 ± 36,68

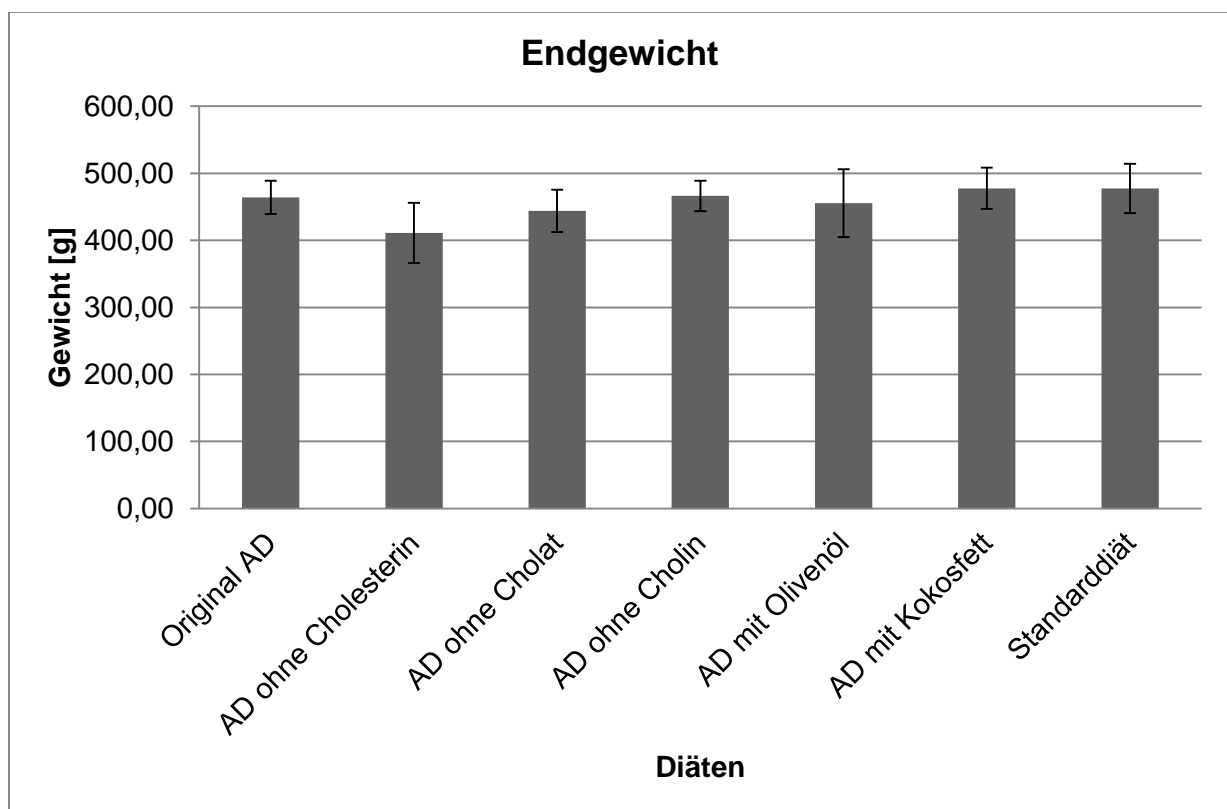


Abbildung 10:

Erreichtes Endgewicht nach Ablauf der Haltungszeit. Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

Ausgehend vom Startgewicht haben die Tiere der Gruppe mit der modifizierten AD mit Kokosfett die größte Gesamtgewichtszunahme ($323,44 \pm 25,20$ g) erzielen können. Ebenso deutlich über 300 g Gewichtszunahme erreichten die Tiere der Original AD Kontrolle und der AD ohne Cholin sowie insbesondere AD mit Kokosfett. Gruppe zwei mit der cholesterinfreien Ernährung nahm im Durchschnitt am wenigsten Gewicht mit nur $258,14 \pm 32,95$ g zu. Ohne statistische signifikante Unterschiede, bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$, zeigen die Ergebnisse dieses Experiments leider nur Tendenzen an (vgl. Tabelle 25 und Abb. 11).

Tabelle 25

Auflistung der Gesamtdifferenz der Gewichtszunahme innerhalb der Haltungszeit nach Gruppen

Gruppe	Differenz [g]
Original AD	$304,81 \pm 21,97$
AD ohne Cholesterin	$258,17 \pm 42,95$
AD ohne Cholat	$294,73 \pm 27,37$
AD ohne Cholin	$306,57 \pm 21,70$
AD mit Olivenöl	$299,70 \pm 44,28$
AD mit Kokosfett	$323,44 \pm 25,20$
Standarddiät	$298,00 \pm 35,59$

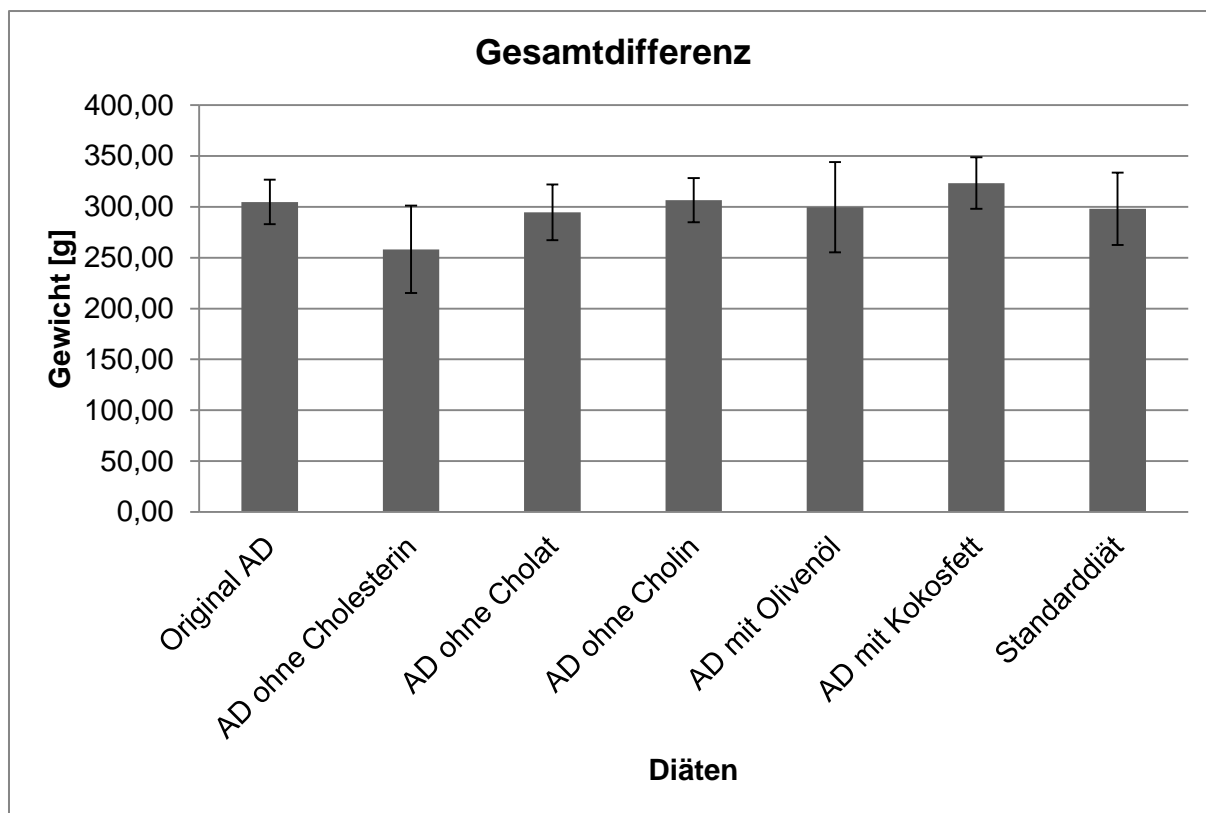


Abbildung 11:

Gesamtdifferenz des Gewichts nach Ablauf der Haltungszeit. Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

Der detaillierte Gewichtsverlauf veranschaulicht die Entwicklung der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen innerhalb der acht Wochen Haltungszeit. Jedoch konnten aus den protokollierten Werten keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Experimental- und Kontrollgruppen registriert werden. (vgl. Tabelle 26 und Abb. 12)

Tabelle 26

Auflistung der Gewichtsverläufe der sieben Versuchsgruppen über die Haltungszeit MZ 1-10

Messzeitpunkt	Original AD	AD ohne Choles- terin	AD ohne Cholat	AD ohne Cholin	AD mit Olivenöl	AD mit Kokosfett	Standard- diät
MZ 1	160,51 ± 6,40	152,66 ± 7,73	149,47 ± 5,78	159,69 ± 4,92	155,84 ± 6,35	154,09 ± 7,01	179,33 ± 4,18
MZ 2	198,70 ± 8,18	187,87 ± 9,90	190,05 ± 8,99	198,32 ± 6,67	193,48 ± 12,14	192,32 ± 8,39	257,67 ± 3,98
MZ 3	266,36 ± 13,22	247,74 ± 14,22	255,65 ± 13,81	266,20 ± 14,60	258,68 ± 16,97	263,48 ± 14,56	306,17 ± 14,54
MZ 4	323,76 ± 13,19	295,33 ± 17,52	304,91 ± 18,93	324,36 ± 17,43	313,39 ± 22,93	325,22 ± 16,64	346,33 ± 20,14
MZ 5	370,43 ± 16,90	331,59 ± 24,58	348,15 ± 22,45	372,18 ± 19,03	359,08 ± 31,23	376,30 ± 18,07	379,67 ± 21,46
MZ 6	409,30 ± 20,11	358,47 ± 34,58	383,97 ± 23,77	410,14 ± 19,71	399,19 ± 38,25	418,84 ± 24,20	396,00 ± 23,91
MZ 7	440,94 ± 22,30	389,27 ± 37,24	415,37 ± 27,75	441,58 ± 22,69	432,16 ± 45,62	452,01 ± 28,17	425,83 ± 24,13
MZ 8	463,96 ± 21,11	414,54 ± 43,42	439,99 ± 31,06	468,05 ± 24,59	450,69 ± 46,70	477,13 ± 30,70	453,00 ± 27,81
MZ 9	472,59 ± 24,68	416,68 ± 44,74	447,82 ± 31,10	475,81 ± 20,88	453,12 ± 48,58	488,66 ± 31,03	474,50 ± 31,55
MZ 10	464,13 ± 24,76	410,84 ± 44,90	444,20 31,52	466,25 ± 22,67	455,54 ± 50,52	477,54 ± 30,72	477,33 ± 36,68

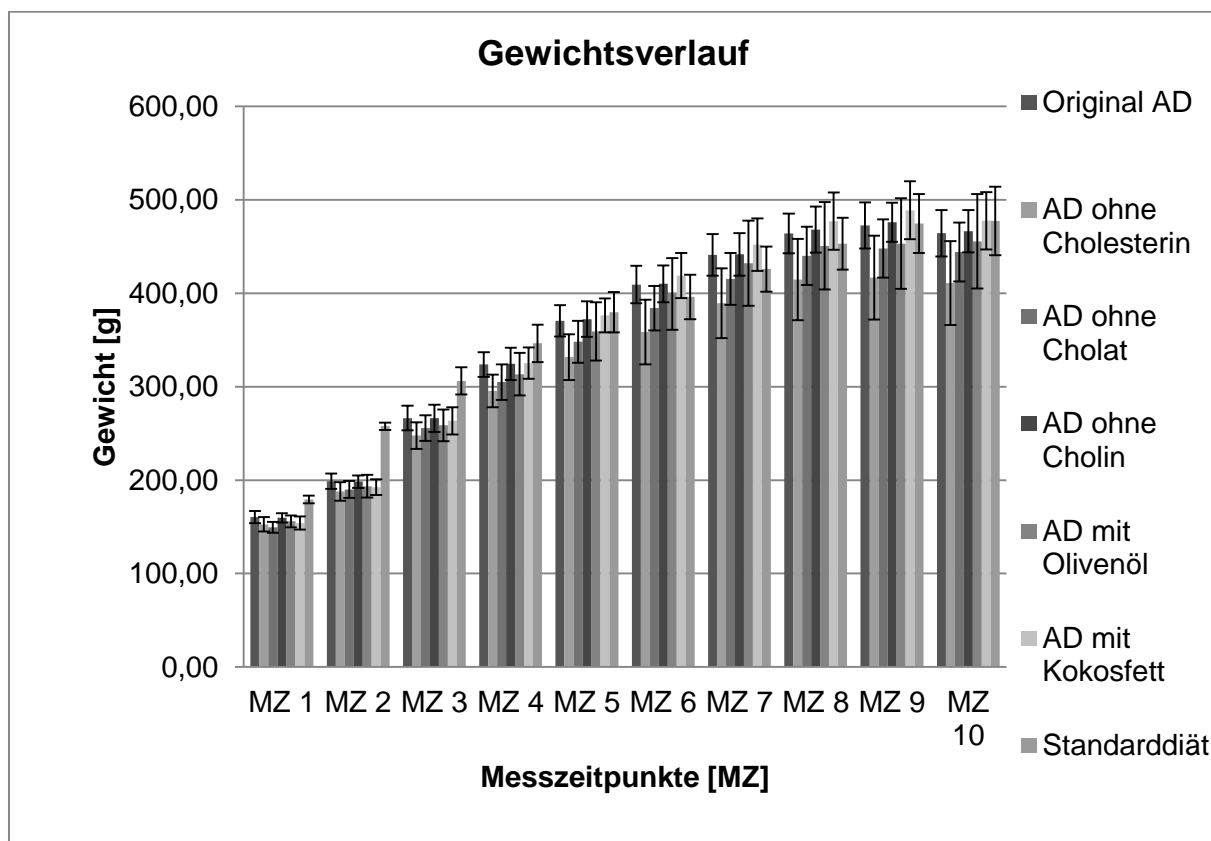


Abbildung 12:

Gewichtsverlauf der sieben Versuchsgruppen über die Messzeitpunkte MZ 1-10. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.1.2 Futtermittelverbrauch

Im Abstand von jeweils sieben Tagen kontrollierten wir den Futtermittelverbrauch jeder Gruppe. Zu diesem Zweck wurde eine ausreichend große, abgewogene Menge des jeweiligen Futters in einem Zeitraum von 24 Stunden angeboten. Die nicht verzehrten Reste der Nahrung wurden anschließend entfernt und abgewogen. Die Differenz der Futtermenge wurde für jede Versuchsgruppe protokolliert. Abhängig von diesem Ergebnis errechnete sich der durchschnittliche Verbrauch pro Tier der Versuchsgruppen (vgl. Tabelle 27 und Abb. 13).

In Abbildung 13 sind die Futtermittelverbrauchskurven für ein durchschnittliches Tier jeder Versuchsgruppe dargestellt. Die dazugehörigen Daten befinden sich in Tabelle 27. Zu Beginn des Experiments (Messzeitpunkte A-B) nahmen die Versuchstiere der Gruppen der AD mit Kokosfett und Standarddiät das meiste Futter auf, während die Tiere der Gruppe mit der AD ohne Cholesterin am wenigsten fraßen. Im Verlauf der Haltung (Messzeitpunkte C-E) verbrauchte die Gruppe der AD mit Kokosfett die größte Futtermenge, gefolgt von der Kontrollgruppe der Original AD. Die Versuchsgruppe AD ohne Cholesterin fraß weiterhin die geringste Futtermenge. Gegen Ende des Versuchs (Messzeitpunkte F-G) verbrauchte die Gruppe mit AD mit Olivenöl das meiste Futter. Ein massiver Abfall war in der Futterkurve von AD mit Kokosfett ersichtlich, wohingegen die Gruppe mit der AD ohne Cholesterin nach wie vor an einem geringen Futtermittelverbrauch festhielt. Trotz der vermeintlichen Tendenzen konnten keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zur Original AD beobachtet werden.

Tabelle 27

Auflistung des Futtermittelverbrauchs innerhalb von 24 Stunden der jeweiligen Gruppen an den Messzeitpunkten A-F

Messzeitpunkt [MZ]	Original AD	AD ohne Cholesterin	AD ohne Cholat	AD ohne Cholin	AD mit Olivenöl	AD mit Kokosfett	Standard diät
A	22,40	18,60	21,80	21,30	21,20	23,90	25,83
B	23,90	21,66	22,73	23,69	26,74	26,41	27,00
C	28,16	20,65	26,74	27,99	28,80	31,79	30,17
D	30,80	22,30	27,70	26,90	28,20	31,20	27,00
E	30,40	22,60	29,20	23,60	28,90	29,60	30,17
F	28,75	21,96	26,56	27,91	30,54	30,51	27,33
G	27,90	21,24	25,84	25,49	32,18	24,42	28,83

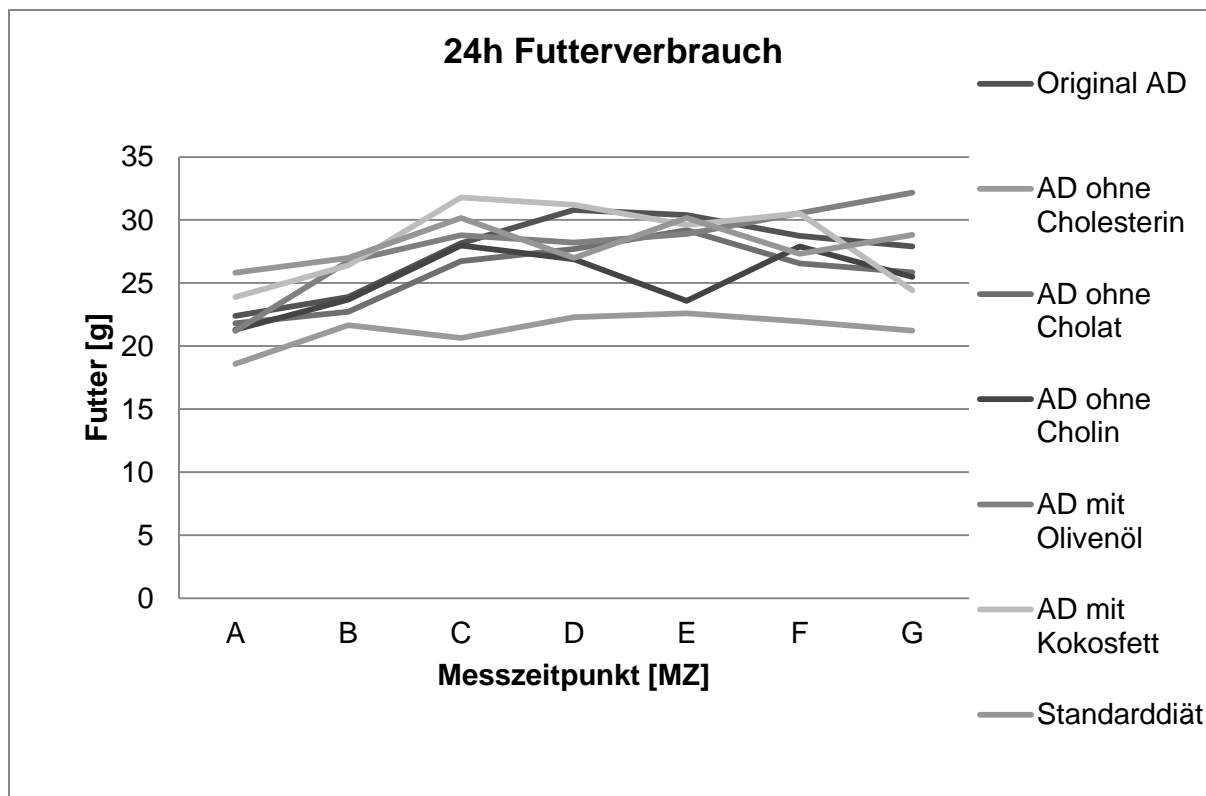


Abbildung 13:

Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier in den Versuchsgruppen innerhalb eines Zeitraums von 24 Stunden an den Messzeitpunkten A-F

5.2 Glukosestoffwechsel

Um eine diabetische Stoffwechsellage der Tiere nachzuweisen, erfolgten nach dem Exitus der Tiere eine Blutzuckermessung aus Schwanzblut sowie eine quantitative Analyse des Plasmas hinsichtlich des Insulinspiegels. Anhand dieser beiden Werte konnte pro Tier der HOMA-Index (Homöostase Model Assessment) als Maß für die Insulinresistenz errechnet werden.

5.2.1 Blutzuckerprofil

Die in Tabelle 28 aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte der Nüchtern-Blutzuckerwerte der einzelnen Gruppen dar. Ein erhöhter Nüchtern-Glukosespiegel kann Anzeichen einer Insulinresistenz sein beziehungsweise auf eine diabetische Stoffwechsellage hinweisen. Die höchsten Werte fallen in der Standarddiät Kontrollgruppe auf, während die niedrigsten Glukosespiegel in der Original AD Gruppe auftreten (vgl. Tabelle 28 und Abb. 14). Jedoch zeigen sich in diesem Experiment im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Tabelle 28

Auflistung der Mittelwerte inklusive der Standardabweichung der Blutzuckerprofile der jeweiligen Gruppen

Diät	Blutzucker [mg/dl]
Original AD	80,2 ± 5,89
AD ohne Cholesterin	82,4 ± 4,72
AD ohne Cholat	90,4 ± 6,88
AD ohne Cholin	89,2 ± 3,96
AD mit Olivenöl	95,2 ± 6,83
AD mit Kokosfett	82,6 ± 2,51
Standarddiät	96,0 ± 5,96

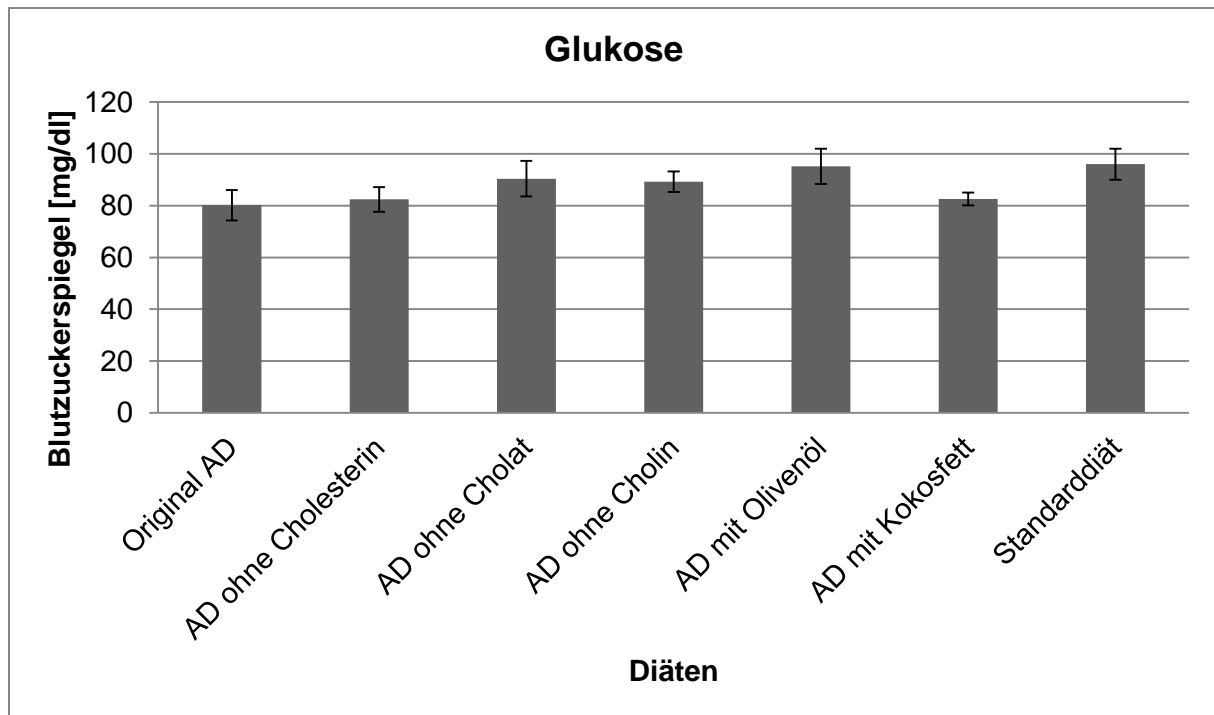


Abbildung 14:

Nüchtern Blutzuckerspiegel. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.2.2 Insulinspiegel

In Tabelle 29 sind die Mittelwerte der Plasmainsulinspiegel der einzelnen Versuchsgruppen aufgelistet. Ein hoher Insulinspiegel deutet auf eine Hyperinsulinämie hin, die als Reaktion bei Insulinresistenz auftreten kann (vgl. Kapitel 2.5). Im Vergleich zu den beiden Kontrollen Original AD und Standarddiät weisen die Gruppen AD ohne Cholat, ohne Cholin und AD mit Olivenöl deutlich erhöhte Werte auf. Jedoch sind nur die Unterschiede der Tiere der AD mit Olivenöl deutlich erhöhte Werte auf. Jedoch sind nur die Unterschiede der Tiere der AD mit Olivenöl (1,53 ± 0,47 µg/l) statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Die Versuchsgruppe der AD mit Kokosnussfett-Diät weist mit 0,60 ± 0,10 µg/l sogar geringere Insulinspiegel als die Kontrollen auf (vgl. Tabelle 29 und Abb.15).

Tabelle 29

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasma Insulinspiegel der einzelnen Gruppen

Diät	Insulin [µg/l]
Original AD	0,75 ± 0,34
AD ohne Cholesterin	0,70 ± 0,39
AD ohne Cholat	1,22 ± 1,39
AD ohne Cholin	1,12 ± 0,64
AD mit Olivenöl	*1,53 ± 0,47
AD mit Kokosfett	0,60 ± 0,10
Standarddiät	0,87 ± 1,43

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

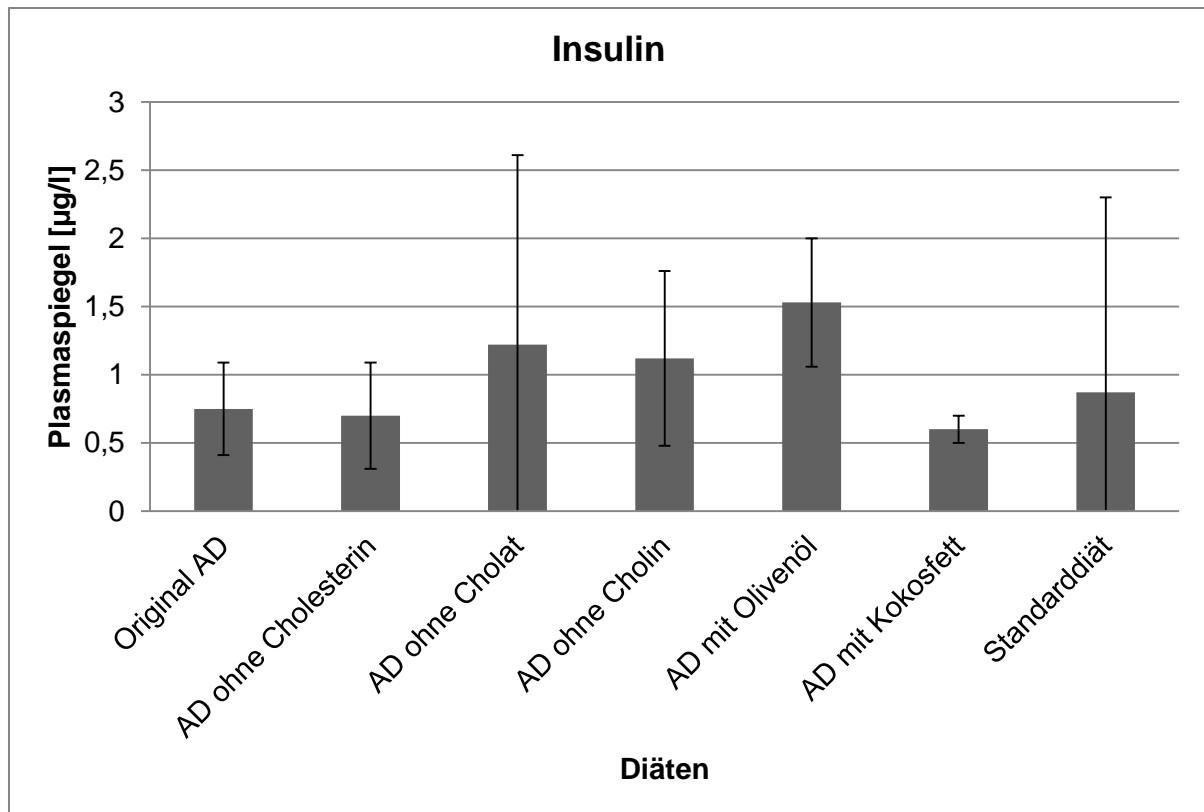


Abbildung 15:

Plasma Insulinspiegel. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.2.3 HOMA-Index

Der HOMA-Index wird zur Abschätzung für das Vorliegen einer Insulinresistenz verwendet. Für jedes Versuchstier wurde mit folgender Formel ein Wert ermittelt:

$$\text{HOMA-Index} = \text{Insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glukose } (\text{mmol/l}) \times 22,5$$

Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen befinden sich in Tabelle 30 sowie in Abb. 16. Wobei ein Wert ≤ 1 als normal und Werte > 2 als ein Hinweis auf eine Insulinresistenz einzuschätzen ist. Bei einem Ergebnis von $> 2,5$ ist Insulinresistenz sehr wahrscheinlich. Ein HOMA-Index von $> 5,0$ ist typisch für eine diabetische Stoffwechsellage. Ausgehend von diesem Bewertungssystem zeigen die Gruppen AD ohne Cholat, ohne Cholin, mit Olivenöl sowie die Standarddiät eine diabetische Stoffwechsellage. Nur die Gruppe AD mit Olivenöl weist statistische signifikante Unterschiede zu der Kontrolldiät Original AD auf ($p \leq 0,05$).

Tabelle 30

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der HOMA-Indizes der einzelnen Gruppen

Diät	HOMA - Index
Original AD	3,72 ± 1,74
AD ohne Cholesterin	3,55 ± 2,00
AD ohne Cholat	7,15 ± 8,51
AD ohne Cholin	6,07 ± 3,12
AD mit Olivenöl	*9,05 ± 3,04
AD mit Kokosfett	3,06 ± 0,46
Standarddiät	5,38 ± 9,10

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

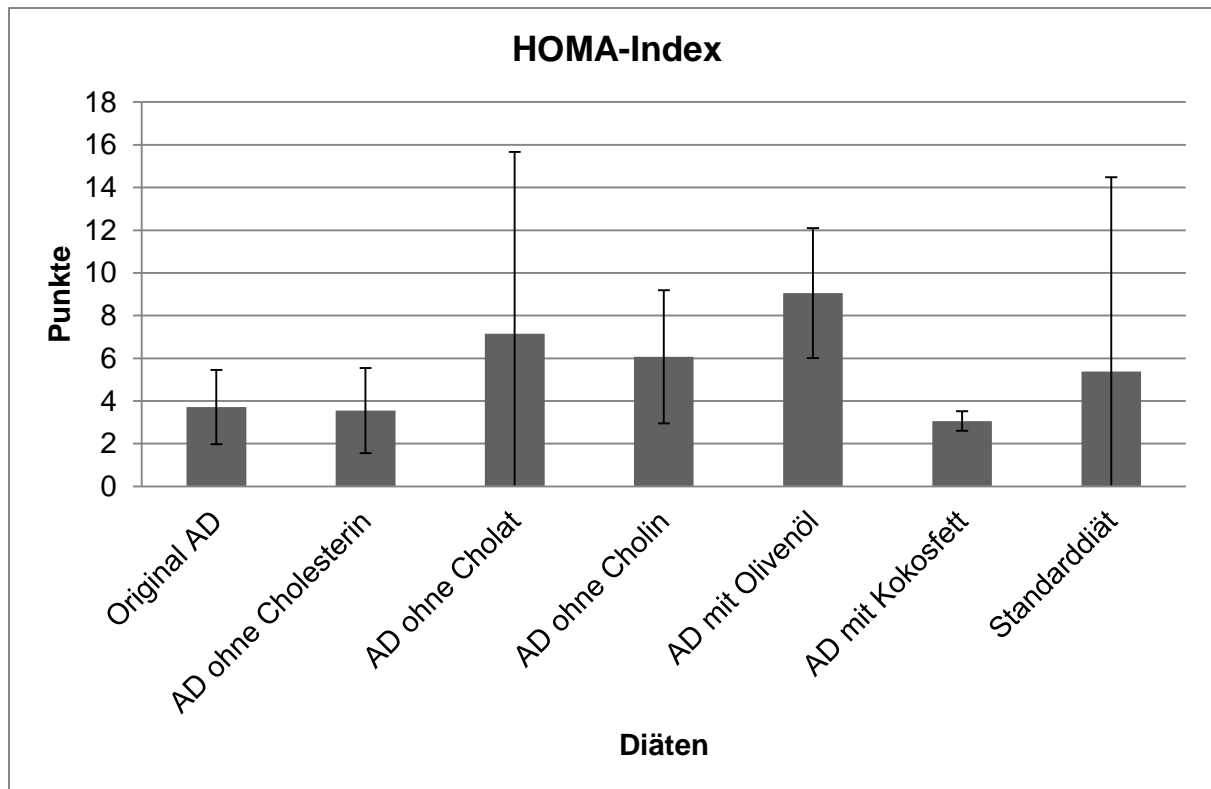


Abbildung 16:

HOMA-Index. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.3 Adiponektin

Die Mittelwerte der Plasmaspiegel für das Hormon Adiponektin jeder Gruppe sind in Tabelle 31 sowie in Abb. 17 zusammengefasst. Niedrige Adiponektinspiegel korrelieren mit Adipositas, Insulinresistenz und NASH (vgl. Kapitel 2.5). Alle AD Varianten zeigen im Vergleich zur Standarddiät geringere Adiponektin Plasmawerte. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p \leq 0,05$) weisen nur die Gruppe mit der AD mit Olivenöl ($2548,8 \pm 502,01$ ng/ml) und die Standarddiät ($6469,0 \pm 698,40$ ng/ml) auf. Ebenfalls stark verringert bei $2791,0 \pm 684,76$ ng/ml, aber ohne statistische Signifikanz, sind die Adiponektinspiegel der AD ohne Cholin-Cl.

Tabelle 31

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasma-Adiponektinspiegel der einzelnen Gruppen

Diät	Adiponektin [ng/ml]
Original AD	$4158,8 \pm 979,22$
AD ohne Cholesterin	$4520,6 \pm 461,87$
AD ohne Cholat	$3696,2 \pm 666,85$
AD ohne Cholin	$2791,0 \pm 684,76$
AD mit Olivenöl	$*2548,8 \pm 502,01$
AD mit Kokosfett	$3746,0 \pm 948,21$
Standarddiät	$*6469,0 \pm 698,40$

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

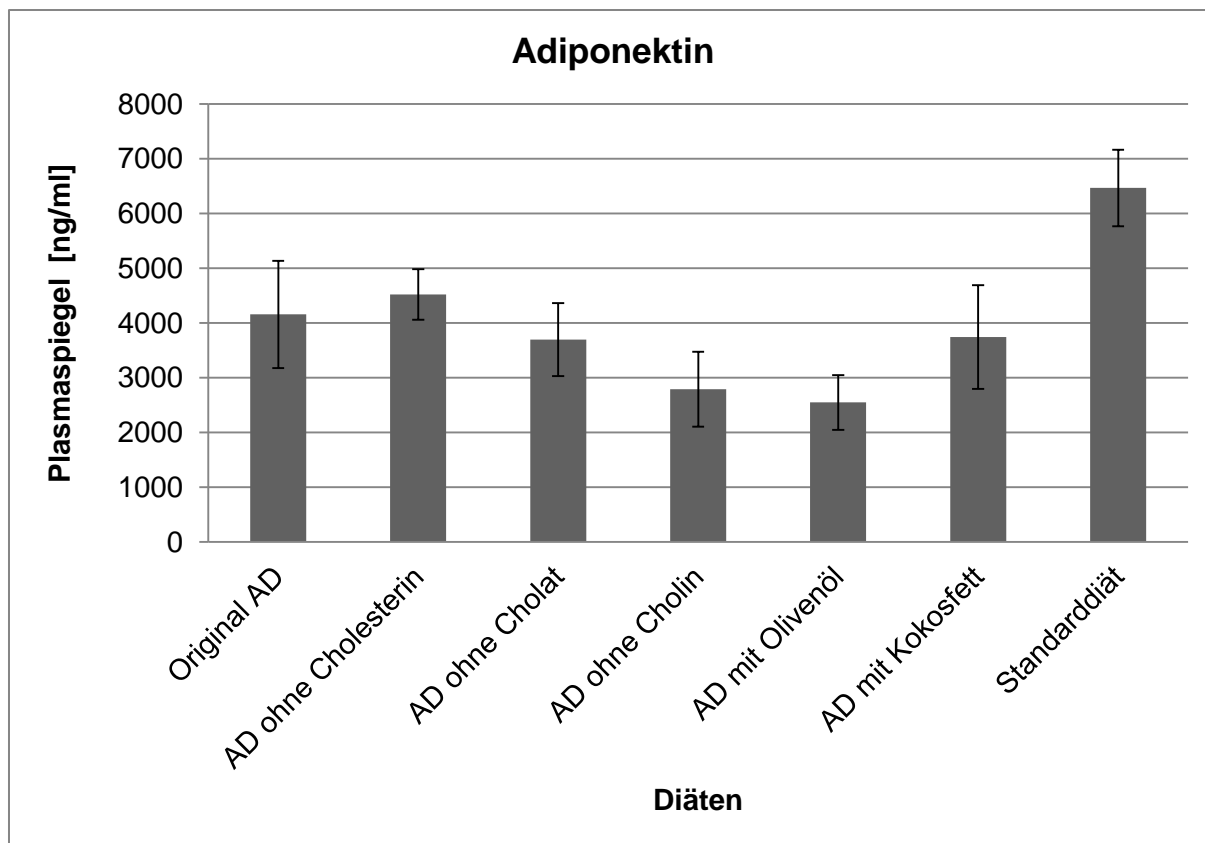


Abbildung 17:

Plasma-Adiponektinspiegel. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.4 Leptin

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, sind erhöhte Plasmaspiegel des Hormons Leptin stark mit der Entwicklung von NASH und Insulinresistenz verbunden. Tabelle 32 und Abb. 18 fassen die Mittelwerte für die Plasma-Leptinspiegel der einzelnen Versuchsgruppen zusammen. Zwischen der Original AD und den Experimentalgruppen bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die niedrigsten Werte erscheinen bei der Original AD Kontrolle und der modifizierten AD ohne Cholin-Cl. Die höchsten Plasmaspiegel wurden bei der Versuchsgruppe AD ohne Cholat registriert. Im Vergleich zur Kontrolle besitzt jedoch keines der Ergebnisse statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Tabelle 32

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasma-Leptinspiegel der einzelnen Gruppen

Diät	Leptin [pg/ml]
Original AD	777,96 ± 146,28
AD ohne Cholesterin	1031,30 ± 255,30
AD ohne Cholat	1391,98 ± 1101,44
AD ohne Cholin	707,32 ± 143,37
AD mit Olivenöl	1013,44 ± 163,51
AD mit Kokosfett	1031,58 ± 210,43
Standarddiät	1095,60 ± 222,85

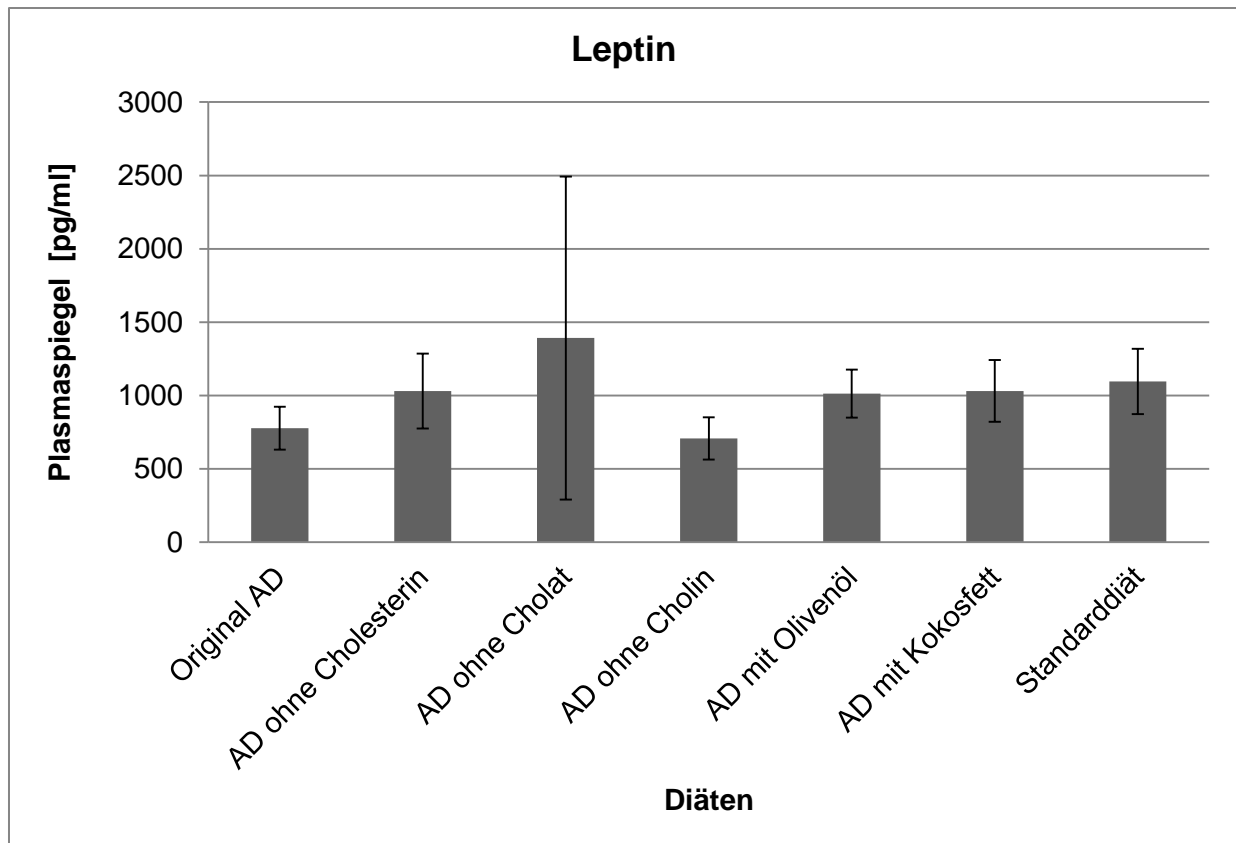


Abbildung 18:

Plasma-Leptinspiegel. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.5 Triglyzeride

5.5.1 Hypertriglyzeridämie

Hypertriglyzeridämie beziehungsweise Dyslipidämie sind Bestandteile des metabolischen Syndroms und eng mit der Pathogenese der nicht-alkoholischen Steatohepatitis verbunden (vgl. Kapitel 2.5). Aus diesem Grund sprechen hohe Triglyzerid-Plasmawerte für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms beziehungsweise einer NASH in den Versuchstieren. Tabelle 33 listet die Mittelwerte der Triglyzeridkonzentrationen im Plasma der Versuchsgruppen auf. Die höchste Konzentration weisen die Tiere mit der Standarddiät auf, während die Tiere der Original AD Kontrollgruppe die niedrigsten Plasma-Triglyzeridspiegel besitzen. Statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) erreichte jedoch keines der Versuchsergebnisse (vgl. Tabelle 33 und Abb. 19).

Tabelle 33

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasma-Triglyzeridspiegel der einzelnen Gruppen

Diät	TG [mg/ml]
Original AD	0,53 ± 0,12
AD ohne Cholesterin	0,87 ± 0,34
AD ohne Cholat	1,01 ± 0,65
AD ohne Cholin	0,67 ± 0,28
AD mit Olivenöl	0,98 ± 0,37
AD mit Kokosfett	0,95 ± 0,44
Standarddiät	1,07 ± 0,35

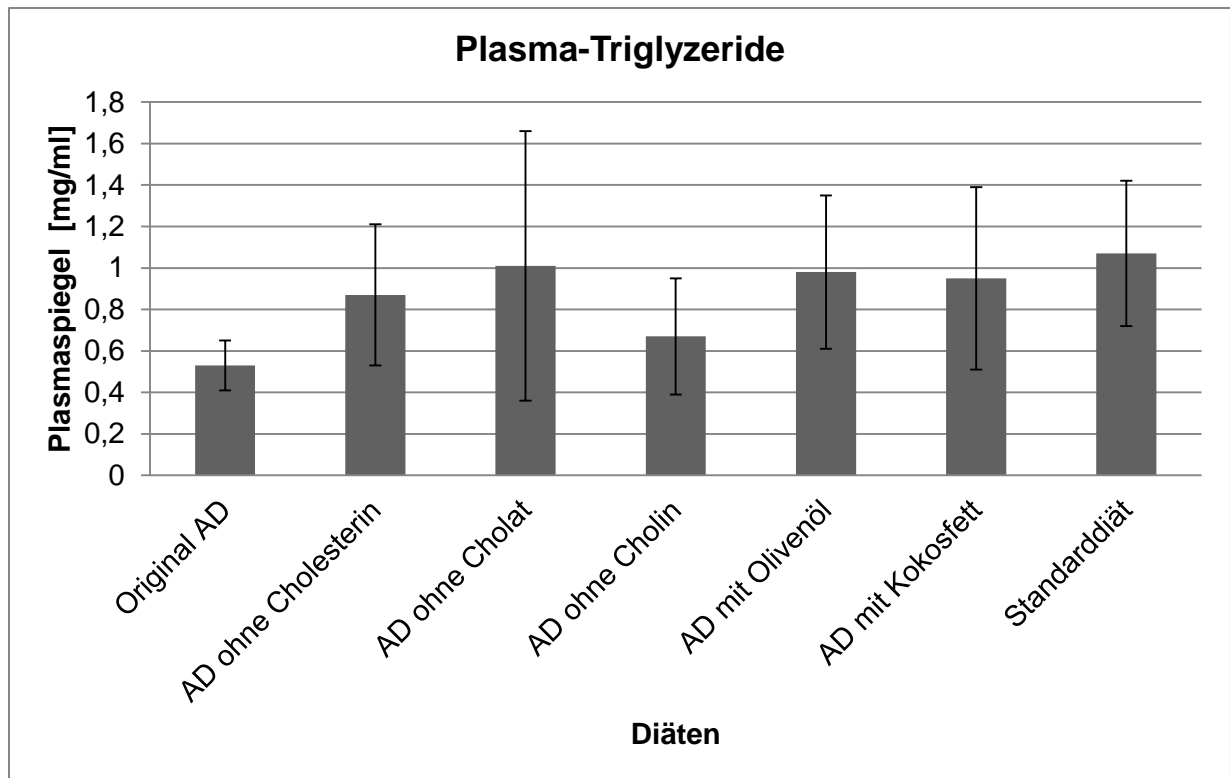


Abbildung 19:

Triglyzeride im Plasma. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.5.2 Hepatische Steatose

Wie bereits in den Kapiteln 2.4.2 und 2.4.3 erwähnt, führt eine andauernde Störung des Lebermetabolismus zur Akkumulation von Lipiden, vor allem von Triglyzeriden, in den Hepatozyten. Diese beeinträchtigen die Homöostase und Funktionalität der Zelle, was zu Zellschäden und oxidativem Stress führt. Dieses Phänomen wird Lipotoxizität genannt. Aus der anfänglich relativ harmlosen und reversiblen Fettleber kann so - durch einen noch genauer zu bezeichnenden second oder third hit - eine NASH entstehen. Hohe Triglyzeridkonzentrationen im Lebergewebe bestätigen eine Steatose in den Versuchstieren. Tabelle 34 zeigt die Mittelwerte der Triglyzeridkonzentrationen im Lebergewebe der einzelnen Versuchsgruppe. Im Vergleich zu der Standarddiät weisen alle Gruppen, die die originale oder eine variierte AD erhielten, stärker verfettete Lebern auf. Besonders massiv tritt die Steatose in der Gruppe mit der modifizierten AD ohne Na-Cholat auf. Dieses Ergebnis besitzt sogar statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$). Die Standarddiät Kontrollgruppe weist im Vergleich zur Original AD statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auf (vgl. Tabelle 34 und Abb. 20).

Tabelle 34

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Triglyzeridmenge im Lebergewebe der einzelnen Gruppen

Diät	TG [mg/g]
Original AD	8,62 ± 3,01
AD ohne Cholesterin	5,64 ± 2,22
AD ohne Cholat	*16,95 ± 3,75
AD ohne Cholin	6,47 ± 2,51
AD mit Olivenöl	8,40 ± 4,24
AD mit Kokosfett	8,60 ± 2,30
Standarddiät	*2,92 ± 1,09

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

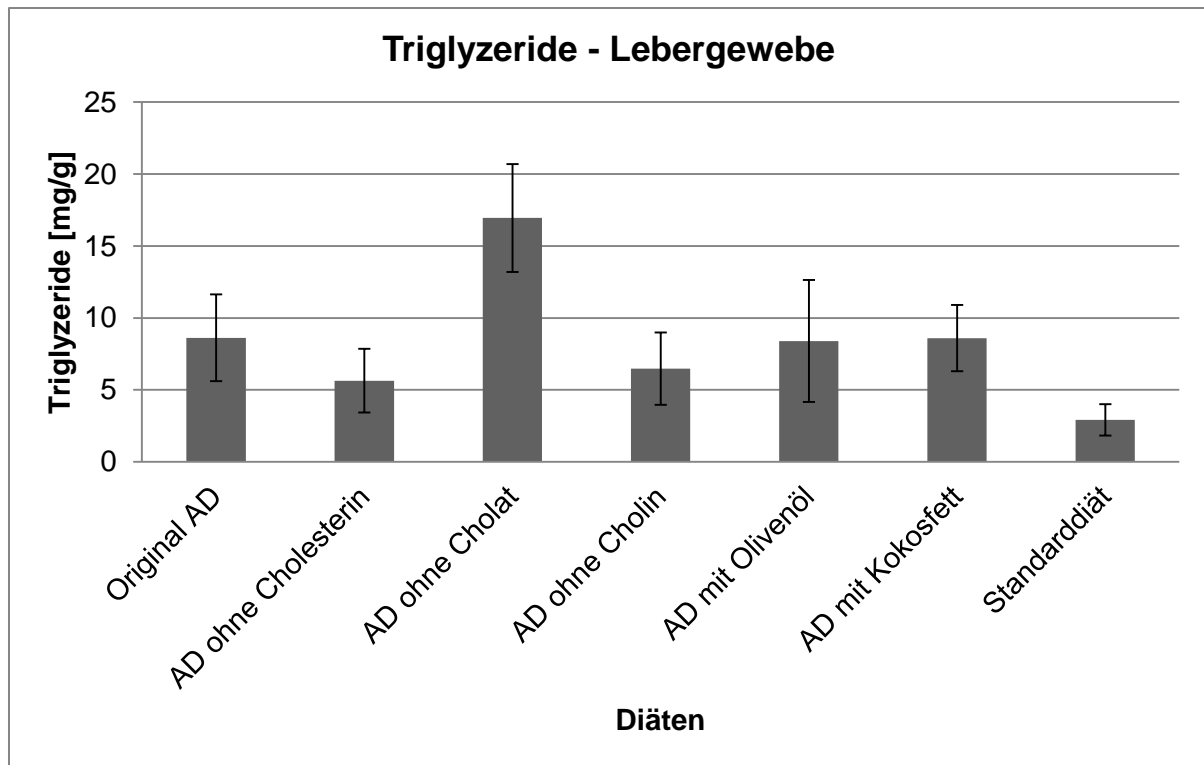


Abbildung 20:

Triglyzeride im Lebergewebe. Mittelwert und Standardabweichung der einzelne Gruppen

5.6 Histopathologisches Scoring der Leberschnitte

Zur histopathologischen Untersuchung wurden die Leberschnitte an Dr. Erwin Gaebele vom Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg geschickt. Unter geblindeten Bedingungen führte dieser eine semiquantitative mikroskopische Analyse der Leberproben durch. Das Scoring umfasste dabei den histologischen Schweregrad der hepatischen Inflammation und Fibrose in den unterschiedlichen Diätgruppen. Gewertet wurden je zehn Gesichtsfelder bei jeweils fünf Schnitten pro Gruppe. Dabei erhielten die Schnitte je nach Schweregrad einen Wert von null bis drei. Die Scores wurden pro Gruppe für Steatose und Inflammation zusammengerechnet und ein Mittelwert gebildet. Dieser Wert und die Standardabweichungen der Ergebnisse können in Tabelle 35 und Abb. 21 eingesehen werden. Zudem wurde ein exemplarischer Ausschnitt jeder Gruppe photographisch festgehalten (Abb. 22-27).

Die Leberhistologie zeigte eine ausgeprägte kleintropfige Verfettung und eine deutliche Inflamationsreaktion in der Original AD Gruppe (Abb. 22) sowie in der AD ohne Cholin (Abb. 25). Hingegen führten die Diätvarianten ohne Cholesterin und ohne Cholatzusatz jeweils zu einer signifikanten Reduktion der Steatose und der Inflammation (Abb. 23-24). Die Gruppen mit Olivenöl (Abb. 26) und Kokosfett (Abb. 27) zeigten eine vergleichbare Steatose wie Original AD, aber eine deutlich reduzierte Inflammation. Das Ergebnis von AD mit Olivenöl war sogar signifikant.

Tabelle 35

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen des Histopathologisches Scoring der einzelnen Gruppen

Diät	Inflammation	Steatose
Original AD	2 ± 0,7	3 ± 0
AD ohne Cholesterin	*0,6 ± 0,5	*0 ± 0
AD ohne Cholat	*0,2 ± 0,5	*0,6 ± 0,5
AD ohne Cholin	2 ± 1	3 ± 0
AD mit Olivenöl	*0,6 ± 0,5	3 ± 0
AD mit Kokosfett	1 ± 1	2 ± 0

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

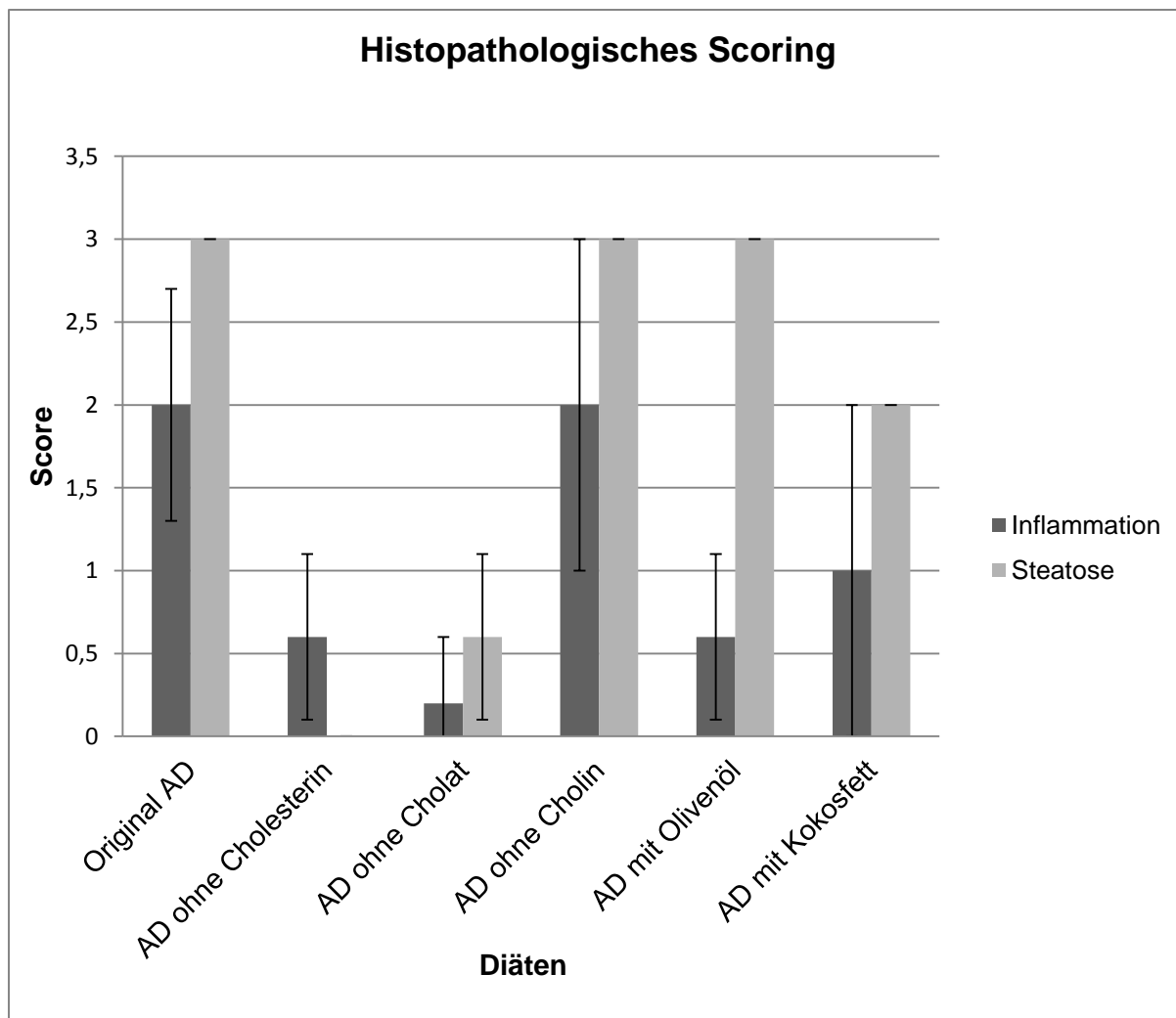


Abbildung 21:

Histopathologisches Scoring. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

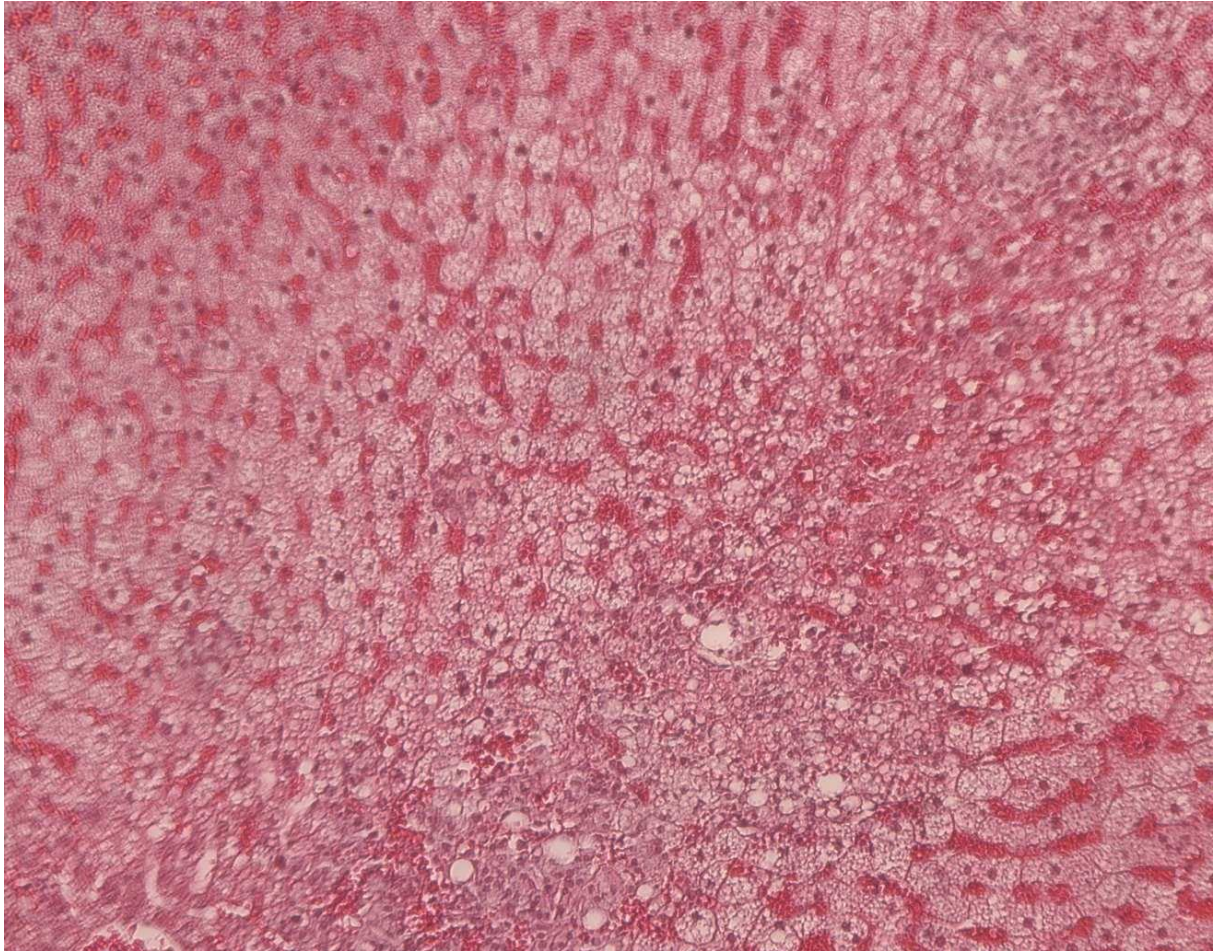


Abbildung 22:

Original AD: Leberhistologie 400-fach vergrößert, ausgeprägte kleintropfige Steatose mit deutlicher Inflammation

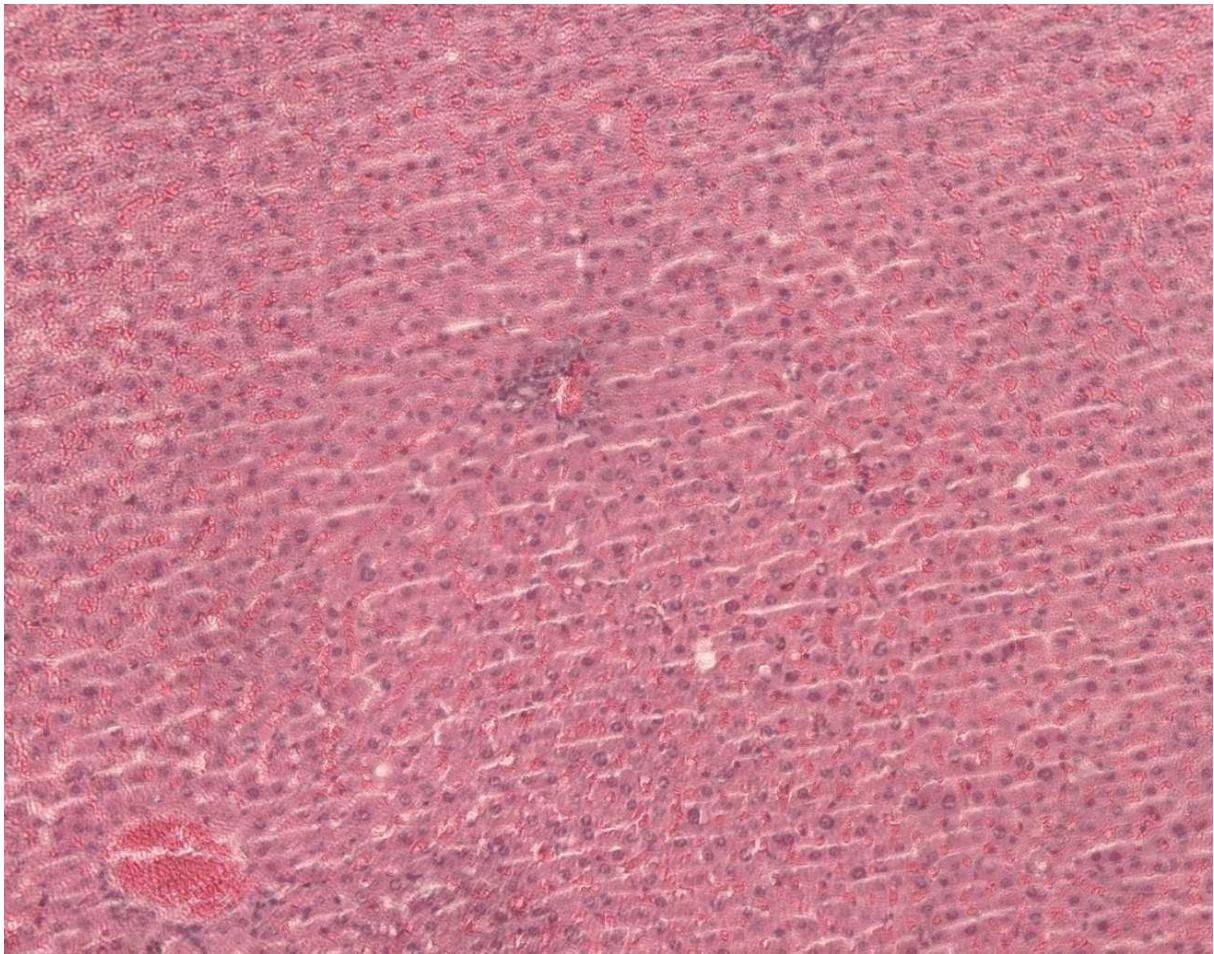


Abbildung 23:

AD ohne Cholesterin: Leberhistologie 400-fach vergrößert, keine Steatose und nur mäßige Inflamationsreaktion

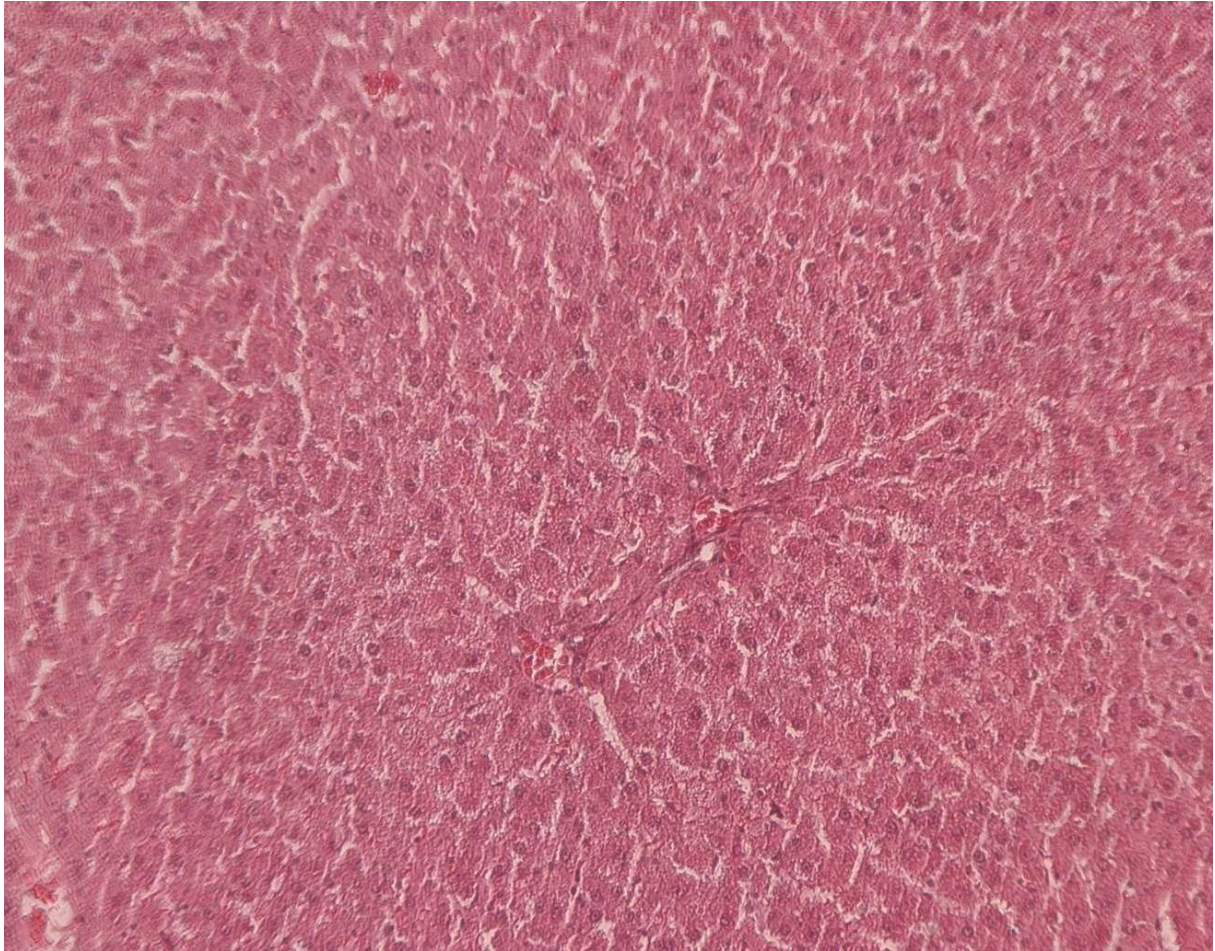


Abbildung 24:

AD ohne Na-Cholat: Leberhistologie 400-fach vergrößert, mäßige Steatose mit geringer Inflamationsreaktion

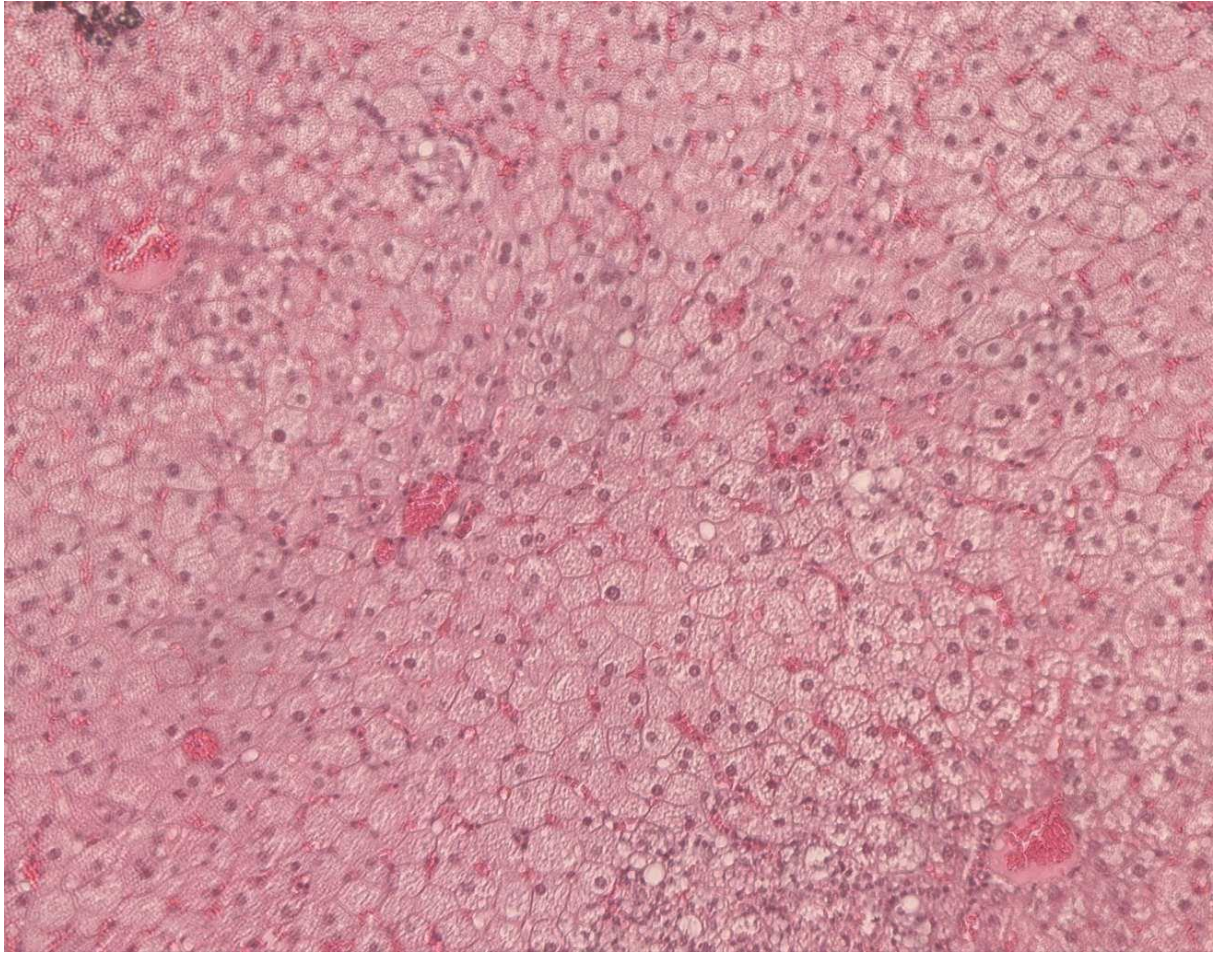


Abbildung 25:

AD ohne Cholin-Cl: Leberhistologie 400-fach vergrößert, ausgeprägte kleintropfige Steatose mit deutlicher Inflammation

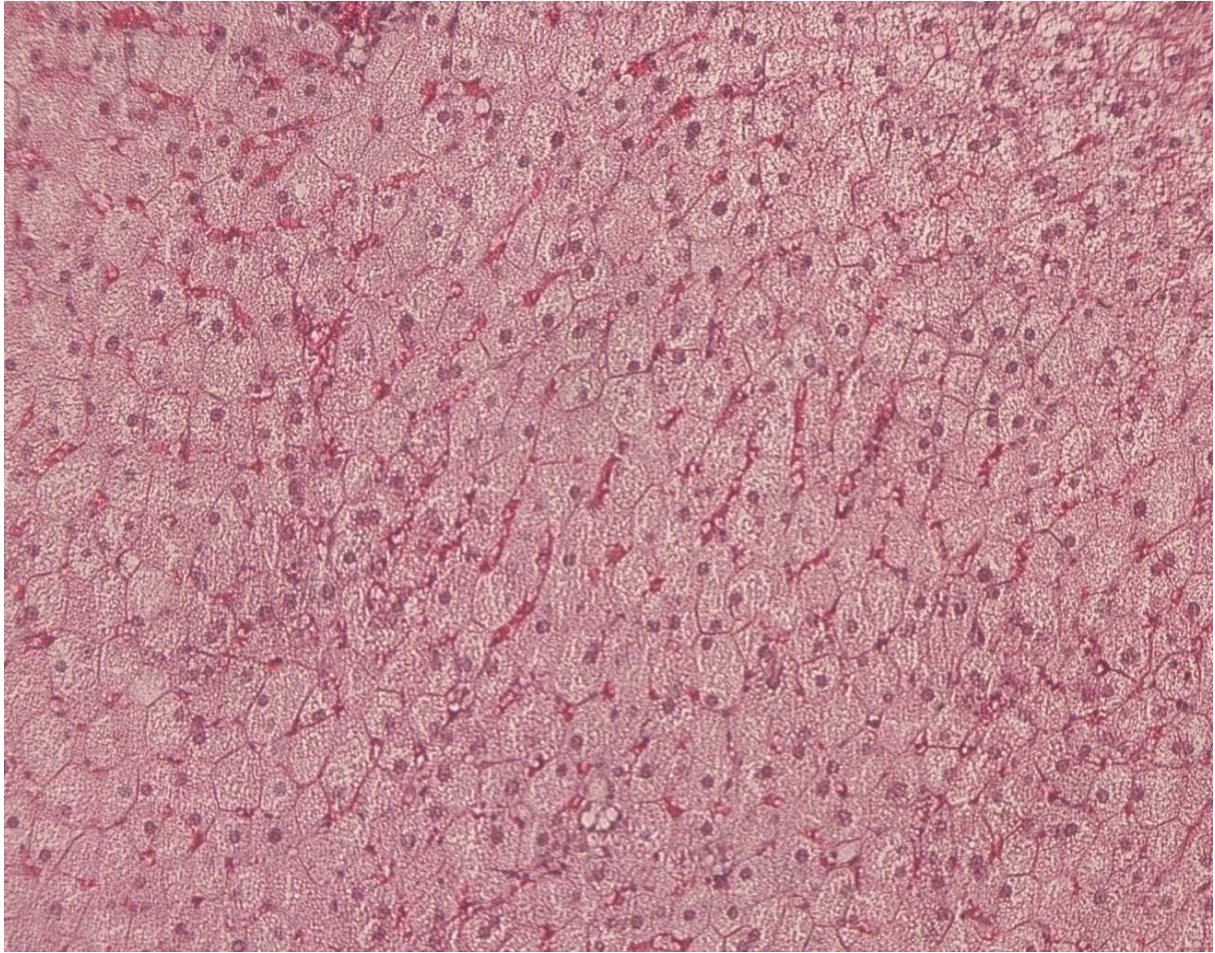


Abbildung 26:

AD mit Olivenöl: Leberhistologie 400-fach vergrößert, ausgeprägte kleintropfige Steatose mit mäßiger Inflammation

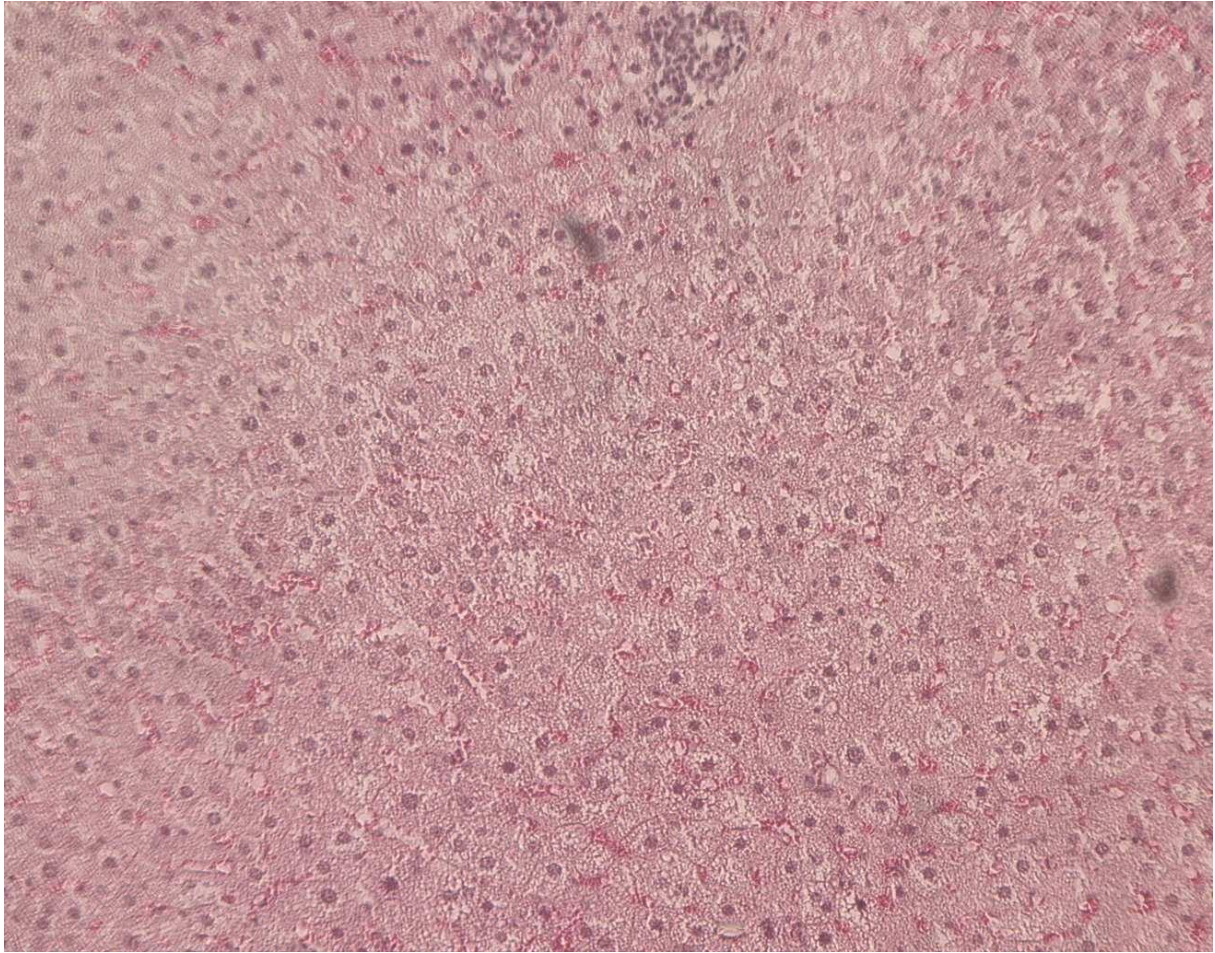


Abbildung 27:

AD mit Kokosfett: Leberhistologie 400-fach vergrößert, deutliche kleintropfige Steatose mit mittelgradiger Inflamationsreaktion

5.7 mRNA-Expressionsprofil

5.7.1 Tumornekrose Faktor-alpha (TNF- α)

Als Zytokin und Adipokin wird TNF- α eine große Rolle bei der Entstehung des metabolischen Syndroms wie auch der nicht-alkoholischen Steatohepatitis eingeräumt (vgl. Kapitel 2.5). Aus diesem Grund sprechen hohe Konzentrationen von TNF- α mRNA für eine verstärkte, aktive Inflammation. Tabelle 36 listet die einzelnen Mittelwerte mit Standardabweichungen für die einzelnen Versuchsgruppen aus der LightCycler® Analyse der Leberproben auf. Tiere, welche die Original AD erhielten, wiesen die stärkste TNF- α mRNA Expression in der Leber auf, wohingegen die AD ohne Cholesterin und normale Standarddiät Kontrolle die geringste Inflamationsreaktion zeigte. Das Ergebnis von AD ohne Cholesterin besaß im Vergleich zur Original AD statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 36 und Abb. 28).

Tabelle 36

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der TNF-alpha Messenger-RNA Konzentration in der Leber der einzelnen Gruppen

Diät	RNA [ng/ μ l]
Original AD	1,000 \pm 0,692
AD ohne Cholesterin	*0,399 \pm 0,300
AD ohne Cholat	0,582 \pm 0,403
AD ohne Cholin	0,799 \pm 0,442
AD mit Olivenöl	0,547 \pm 0,377
AD mit Kokosfett	0,580 \pm 0,290
Standarddiät	0,232 \pm 0,120

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

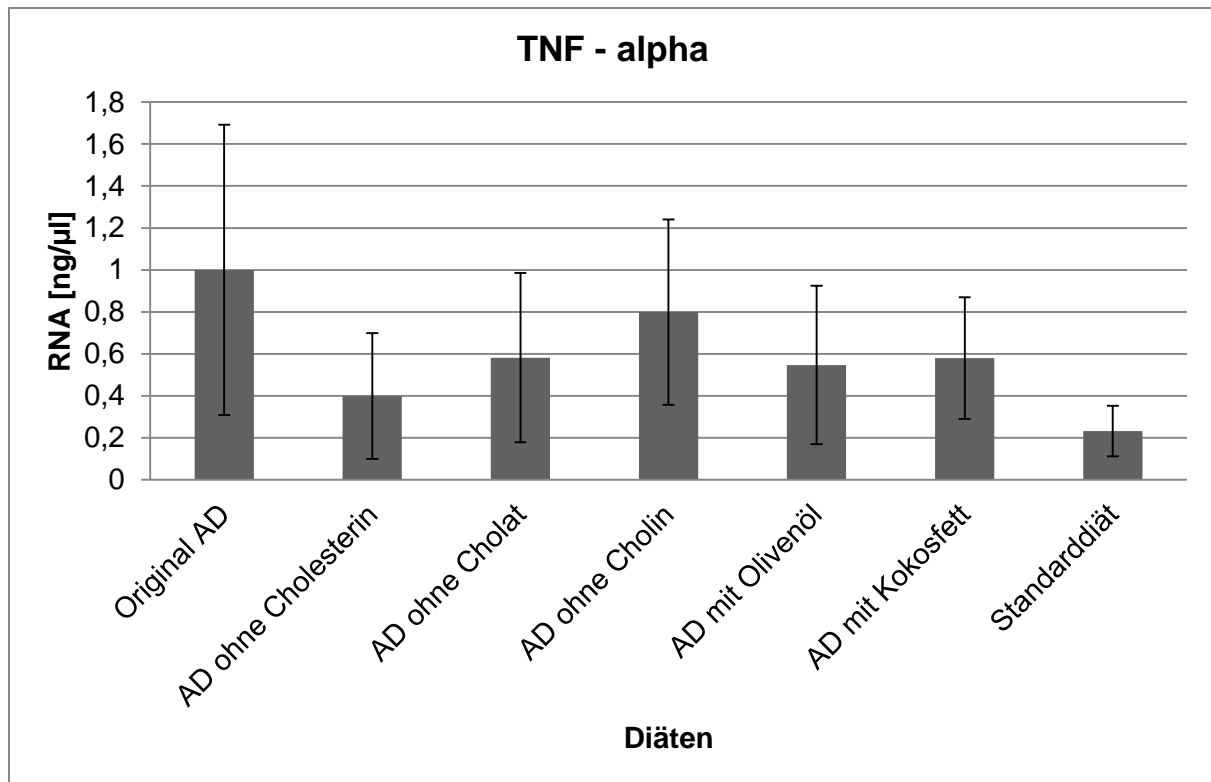


Abbildung 28:

TNF-alpha Messenger-RNA Konzentration in der Leber. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

5.7.2 Kollagen Typ I alpha 1

Kollagen Typ I alpha 1 ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix hepatischer Fibrozyten, das bei Narbenbildung und fibrotischem Umbau verstärkt exprimiert und somit auch sezerniert wird. Aus diesem Grund ist die mRNA dieses speziellen Kollagens besonders geeignet als Maß zur Abschätzung der hepatischen Fibrose. Daraus folgend deuten also erhöhte Werte auf hohe fibrotische Umbauaktivität hin. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus der LightCycler® Analyse der einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 37 enthalten. Wiederum war die höchste Expressionsrate in der Gruppe der Original AD nachweisbar, während die geringste Antwort in der Standarddiät Kontrolle zu finden waren. Ähnlich niedrige Werte für die Expression der mRNA des Kollagens traten in den Experimentalgruppen ohne Cholesterin und ohne Cholat auf. Diese Ergebnisse wiesen eine statistische Signifikanz auf einem Niveau von $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Original AD Kontrollgruppe auf (vgl. Tabelle 37 und Abb. 29).

Tabelle 37

Auflistung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Kollagen Typ I alpha 1 Messenger-RNA Konzentration in der Leber der einzelnen Gruppen

Diät	RNA [ng/μl]
Original AD	1,000 ± 1,029
AD ohne Cholesterin	*0,127 ± 0,114
AD ohne Cholat	*0,190 ± 0,187
AD ohne Cholin	0,392 ± 0,475
AD mit Olivenöl	0,321 ± 0,255
AD mit Kokosfett	0,213 ± 0,117
Standarddiät	0,114 ± 0,08

* statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$)

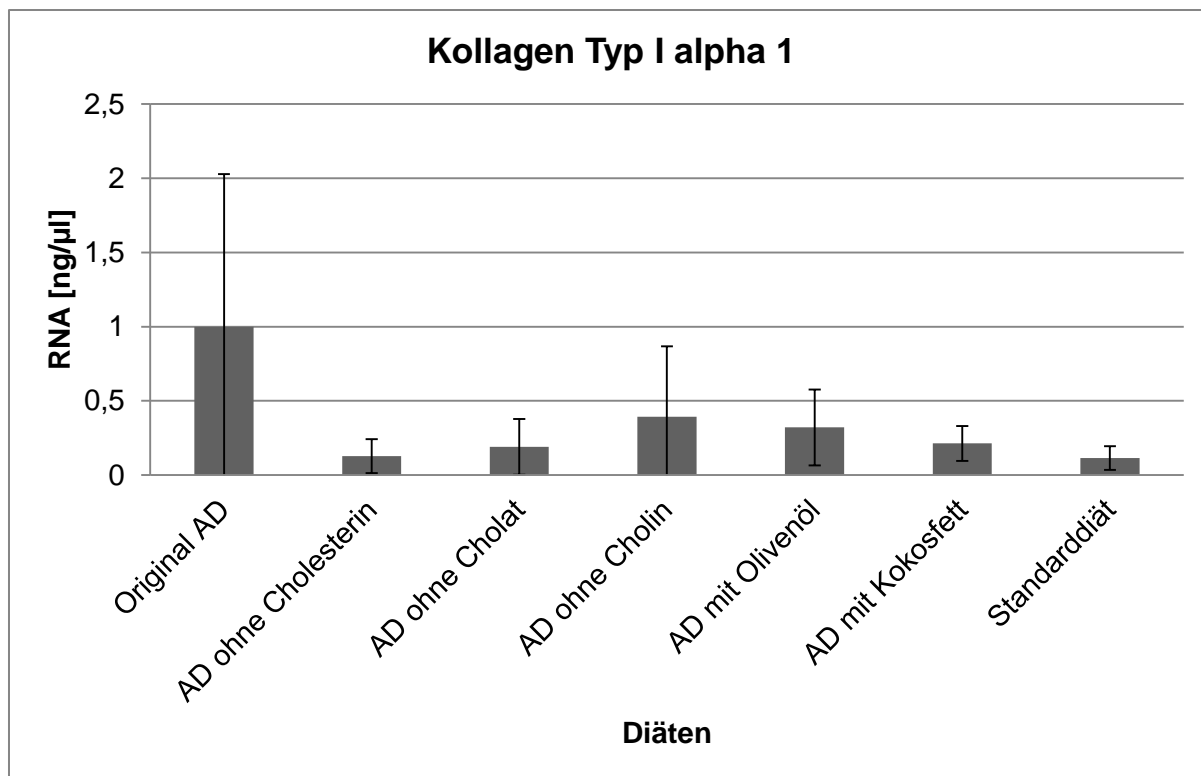


Abbildung 29:

Kollagen Typ I alpha Messenger-RNA Konzentration in der Leber. Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Gruppen

6. Diskussion

6.1 Stand der Forschung

Mit einer Inzidenz von etwa 25% in der erwachsenen Bevölkerung der westlichen Industrienationen hat die NAFLD eine große volkswirtschaftliche und epidemiologische Bedeutung¹²⁻¹⁵. Aus dem breiten Manifestationsspektrum ist die NASH die wichtigste Form. Es ist hierbei eine etablierte Tatsache, dass das metabolische Syndrom als Hauptrisikofaktor für eine NASH verantwortlich ist. Nur eine Subpopulation der NASH-Patienten entwickelt eine progrediente Fibrosierung des Lebergewebes bis hin zum Endstadium einer Leberzirrhose. Zudem variieren in den Fallstudien sowohl das Ausmaß des fibrotischen Umbaus als auch der zeitliche Ablauf. Die einzelnen Schritte der Lipidakkumulation in den Hepatozyten, der Entzündungsreaktion und der Fibrose werden jeweils durch Insulinresistenz potenziert. Bisher konnte jedoch keine ausreichende Erklärung für die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sowie die Ursache der äußerst individuellen Krankheitsverläufe geliefert werden. Aktuelle Studien favorisieren die „multi-hit“ Hypothese, welche einer Progression der Steatosis zur Entzündung beziehungsweise der reaktiven Fibrosierung jeweils durch unterschiedliche pathophysiologische Ereignisse, den sogenannten "hits" verursacht werden. Da in der medizinischen Forschung sowohl gesundes als auch erkranktes menschliches Gewebe nur eingeschränkt zur Verfügung steht, haben sich geeignete Tiermodelle als Mittel der Wahl zur Erforschung der Pathogenese von Erkrankungen etabliert. Jedoch kann sich das Design eines solchen Modells als äußerst schwierig erweisen, da sowohl vom wissenschaftlichen als auch vom ethischen Standpunkt betrachtet, nicht nur das pathologische Korrelat des menschlichen Krankheitsbildes abgebildet werden, sondern dieses auch mit der ursprünglichen Ätiologie und Entwicklung im Kontext stehen sollte^{141,142}.

Bisherige Studien erreichten nur eingeschränkte Gültigkeit, indem zwar Aspekte des metabolischen Syndroms inklusive einer NASH abgebildet wurden, jedoch auf Kosten eines unphysiologischen Studiendesigns. Als polygenetische Erkrankung wird das metabolische Syndrom inklusive der NASH durch zahlreiche Umweltfaktoren und -stressoren beeinflusst^{12,107}. Da Wildtyptiere keine spontane NASH ausbilden, gibt es bisher kein adäquates Tiermodell, das identisch mit der menschlichen Erkrankung verläuft¹². Als Grundlage dieser Arbeit diente der physiologische Ansatz von Paigen et al., die Fütterung einer speziellen Hochfettdiät, der sogenannten atherogenen Diät nach Paigen (kurz AD), um adipöse Tiere zu generieren¹³². Diese spezielle Futtersorte fördert wie übliche Hochfettdiäten Hyperglykämie und Insulinresistenz im gesamten Organismus. Viele Studien haben diese Effekte auf die Leber- und Muskelphysiologie untersucht. Ausgehend von diesen Ergebnissen und

Erfahrungen ist allgemein anerkannt, dass Hochfettdiäten ein metabolisches Syndrom mit Insulinresistenz und unterdrückter β -Zellfunktion hervorrufen können^{107,127–129}. Eines der Ziele dieser Arbeit beinhaltete die Etablierung eines diätetischen Tiermodells der NASH, das in wesentlichen pathogenetischen Aspekten und im Hinblick auf Lebermetabolismus, Expressionsprofil proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren mit der menschlichen Fettlebererkrankung übereinstimmt. Ferner soll durch diätetische Interventionen eine Modifikation der erzeugten NASH erreicht werden. Vor allem der Einfluss der Fettkomponente der Diäten auf Inflammation und metabolische Veränderungen in den Versuchstieren sollte untersucht werden. Mit dieser Studie ist es uns gelungen, die unterschiedlichen Einflüsse diätetischer Fettkomponenten auf das Ausmaß der diätetisch induzierten Leberverfettung und Inflammation nachzuweisen. Insbesondere der Interaktion von Cholesterol und bestimmten Fettsäureresten konnte eine zentrale Bedeutung eingeräumt werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch entgegen unserer Erwartung eine Entkopplung der fettinduzierten Effekte vom metabolischen Profil des Tiermodells der NASH dieser Studie.

6.2 Vergleich unterschiedlicher Diätregimes mit den Diäten dieser Studie

Ausgehend von der atherogenen Diät nach Paigen, einer Diätkomposition angereichert mit Cholesterol, die neben Cholat- und Cholinanteilen eine leicht erhöhte Triglyzeridkomponente (etwa 15 Energieprozent) auf Kakaobutter bzw. Schweineschmalzbasis enthält, konnten hepatische Fettablagerungen sowie periportale Inflammation inklusive einer Erhöhung von TNF- α im Gegensatz zu konventionellen Diäten, repräsentativ das Standard-Nagerfutter dieser Studie, nachgewiesen werden. Abseits der ursprünglichen Intention als Arteriosklerosemodell wurden Variationen der AD nur selten zur Erforschung der NASH eingesetzt. Bereits 1993 beobachteten Liao et al. als Ergebnis einer Diätintervention mit einer AD die Aktivierung des hepatischen NF- κ B, der nachweislich bei oxidativen Stress aktiviert wird und zusätzlich bei der Transkriptionsregulation einiger zugehöriger Gene beteiligt ist¹⁴³. Den Forschungsgruppen um Matsuzawa und um Dorn gelang es kürzlich nach 24 Wochen Fütterung von Diäten, die fast identisch zur AD dieser Studien waren, in C57/BL6 Mäusen Hepatomegalie inklusive der histologischen Kriterien der menschlichen NASH (Steatose, Fibrose und zelluläres Ballooning) bei erhöhten TNF- α und MCP-1 hervorzurufen^{144,145}. Ziel dieser Arbeit war darüber hinaus, die individuellen pathophysiologischen Einflüsse der Komponenten der AD hinsichtlich hepatischer Schäden und metabolischen Störungen herauszufiltern. Zu diesem Zweck wurden einige Nahrungsbestandteile der Diät, insbesondere die Cholesterolkonzentration sowie die Fettsäurekomposition des Futters verändert. Um eine Unausgewogenheit der Ernährung, die per se schädlich wirken könnte, zu vermeiden, wurde die Gesamtmenge des diätetischen Triazylglycerols nicht angetastet.

Nach Abschluss der Experimente konnten wir die in Ziffer 6.3ff beschriebenen Begebenheiten beobachten.

6.3 Diätetisches Cholesterol begünstigt hepatische Entzündung

Die Variation AD ohne Cholesterolanteil, aber mit derselben von Fett gelieferten Energiemenge, verursachte weder eine relevante hepatische Steatose noch eine inflammatorische oder fibrotische Antwort. Dies konnte sowohl in der histologischen Beurteilung der Leberschnitte, als auch in der molekularen Analyse von TNF- α und Kollagenexpression nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Cholesterol bei der Entstehung der NASH eine entscheidende pathophysiologische Rolle einnimmt. Diese These wird durch einige aktuelle Tierstudien sowie klinische Beobachtungen gestützt, die eine direkte Verbindung zwischen dem diätetischen Cholesterol und hepatischer Entzündung sehen. NASH-Patienten verzehren gegenüber gesunden Kontrollgruppen meist mehr Cholesterol. Ebenso liegt eine schrittweise Steigerung des freien Cholesterols in der Leber von NAFLD zur NASH vor^{146–148}. So zeigen die Analysen von Lipidzusammensetzungen menschlicher Leberproben von Patienten mit NAFLD und NASH eine zweifach höhere Konzentration von freiem Cholesterol als in den Kontrollen. Dies war zudem mit einem Anstieg des Serumcholesterols verbunden, während die Cholesterolester im Lebergewebe keine Änderungen gegenüber der Kontrolle aufwiesen^{147,149}. Versuche mit LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen bestätigten die Existenz eines kausalen Zusammenhangs zwischen hepatischer Inflammation und freiem hepatischen Cholesterol¹⁵⁰. Dieser Effekt wird mit hoher Wahrscheinlichkeit von den Scavenger-Rezeptoren der Kupffer'schen Sternzellen, den spezialisierten Makrophagen der Lebersinusoide, vermittelt¹⁵¹. Die Untersucher Mari et al. entwarfen ein Tiermodell, um die Rolle der diätetischen Belastung von freiem Cholesterol zu untersuchen. Hierzu erhielten männliche Sprague-Dawley Ratten eine hypercholesterolämische Diät mit zwei Prozent gereinigtem Cholesterol mit oder ohne 0,5% Natriumcholat. Als Kontrolle fungierte die sogenannte Lombardi-Diät, die unzureichend Cholin, aber ausreichend Methionin enthält sowie die korrespondierende Diät mit Cholinergänzung. Im Versuch entwickelten die Ratten, welche die cholesterinreiche Ernährung erhielten, eine mikrovesikuläre Steatose und waren anfällig gegenüber der apoptotischen Wirkung von TNF- α , wohingegen die Kontrolldiät eine makrovesikuläre Steatose ohne Anfälligkeit gegenüber TNF- α in den Ratten bewirkte^{149,152}. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass die Belastung mit freiem Cholesterol im Modell von Mari et al. unzureichend war, um ER-Stress zu erzeugen¹⁴⁹. Laut Malhi et al. (2008) lag die Ursache der beobachteten Sensibilisierung für TNF- α in den entleerten mitochondrialen Glutathionspeicher. Somit konnte dieser Zustand durch die Gabe von S-Adenosyl-L-Methionin, das die

Speicher wieder auffüllte, rückgängig gemacht werden^{149,152}. Entgegen aller Erwartungen berichtet eine Studie von Wouters et al. anhand der Expressionsanalyse von proinflammatorischen Markern von nur einer leichten Hepatitis. Die eingesetzte Hochfettdiät besitzt jedoch nur einen absoluten Cholesterolanteil von 0,2%³⁰. Dies ist bei weitem ein geringerer Anteil als in den AD dieser Studie. Allerdings zeigte sich bisher in klinischen Studien, dass die Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese keinen positiven Einfluss auf die menschliche Verlaufsform der Erkrankung ausüben kann. Hinweise dafür erbrachte eine kürzliche Studie mit Statinen von Nelson et al., die jedoch zu keiner relevanten Besserung der hepatischen Entzündung der NASH Patienten führte¹⁵³.

Im Einklang zum aktuellen Forschungsstand lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studie ein dosisabhängiger Effekt des diätetischen Cholesterols auf die Hepatitis schließen, während eine unspezifische toxische Reaktion auszuschließen ist. Entgegen der Beobachtungen von Basciano et al. zeigte sich in unserer Studie keine intrinsische steatogene Wirkung von Cholesterols hinsichtlich des Triglyzeridgehalts der Leber¹⁵⁴, da diese Untersucher in einem Tierversuch mit Hamstern eine Futtermischung mit hohem Fructosegehalt (40 Gewichtsprozent) und einem deutlich höheren Neutralfettgehalt (30 Gewichtsprozent) einsetzten. Kritisch ist nun anzumerken, dass eher wohl eher die erhöhte Fettmenge für die hepatische Fettdeposition verantwortlich zu machen ist. Es obliegt nun künftigen klinischen Studien nachzuweisen, ob eine diätetische Reduktion der Cholesterolaufnahme auch einen Einfluss auf die NASH in menschlichen Versuchspersonen ausüben kann.

6.4 Einfluss der Fettsäurekomposition einer atherogenen Diät auf die NASH

Die Struktur diätetisch aufgenommener Fettsäuren hat mit hoher Wahrscheinlichkeit große Auswirkungen auf eine Vielzahl essentieller Zellfunktionen. In einem kürzlich erschienenen Review von den Autoren Malhi und Gores wird die Rolle von freien Fettsäuren in NAFLD und NASH anhand aktueller Studien betrachtet. Zirkulierende freie Fettsäuren liefern Substrate für die Triglyzeriddeposition in der Leber, können aber auch per se zytotoxische Effekte direkt bewirken. In NAFLD gehört Apoptose der Hepatozyten zu den histologischen Schlüsselfaktoren und korreliert stark mit progressiver Entzündung sowie Fibrosierung des Lebergewebes. Zwar sind die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig gelöst, jedoch besteht ein starker Verdacht, dass Apoptose durch freie Fettsäuren zur Pathogenese der NASH beiträgt¹⁴⁹. Die apoptotische Wirkung von gesättigten Fettsäuren konnte in vielen Zelltypen beobachtet werden. So löst Palmitinsäure in Betazellen des Pankreas^{149,155,156}, in Herzmuskelzellen^{149,157}, in mikrovaskulären Endozellen¹⁵⁸ sowie in Hepatozyten und vielen anderen Zellen Apoptose aus. Ähnliche Effekte, aber in abgeschwächter Form, wurden bei

einfach ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure oder Palmitoleinsäure beobachtet¹⁵⁹. Dabei wurden mehrere Möglichkeiten des durch freie Fettsäuren ausgelösten Zelltods beobachtet. Zum einen können FFA das proapoptische Protein Bax auf einem c-jun N-terminale Kinase abhängigen Weg aktivieren und somit im Kern den Apoptosemechanismus auslösen. Zum anderen wurde die stimulierende Wirkung von FFAs über den lysosomalen Signalweg auf den Zelltod und die Regulation der Genexpression des Todesrezeptors beschrieben. Insbesondere erwähnen die oben genannten Autoren auch die Apoptosewege, welche durch Ceramide und Phosphatidylcholin ausgelöst werden. Ferner besitzt die Fettsäurestruktur relevanten Einfluss auf weitere zelluläre Funktionen. Nennenswert wären hierbei der oxidative Stress und ER Stress, die beide eng mit der Pathogenese der NASH assoziiert werden, sowie die Modulation der Immunantwort und der Entzündungsreaktion¹⁴⁹. Aus diesem Grund lag es nahe, den Einfluss von Variationen der atherogenen Diät nach Paigen mit unterschiedlichen Fettsäurekompositionen zu untersuchen. In diesem Versuch wurden zwei AD Varianten mit unterschiedlichen Quellen der Neutralfettkomponente gewählt. Die erste Variation enthielt vorwiegend die aus Kokosfett gewonnenen, mittelkettigen Fettsäurereste, wie Laurin- und Myristinsäure. Eine weitere Diätkomposition basierte vor allem auf Olivenöl, wodurch dieses Futter reich an der langkettigen einfach ungesättigten Ölsäure war. Als Kontrolle fungierte die Original AD, die ihren Fettanteil aus Kakaobutter sowie Schweineschmalz bezog und somit vorwiegend die langkettigen gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure und Stearinsäure sowie Anteile von Ölsäure enthielt. In diesem Teilexperiment wurde die Menge des Cholesterol-, Cholat- und Cholinanteils nicht verändert.

6.4.1 Kokosfett als Fettbasis

Die Versuchsgruppe, welche die mit Kokosfett angereicherte AD erhielt, lieferte Ergebnisse, die keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mit der unveränderten AD aufwiesen. Eine Erklärung hierfür könnten einige aktuelle Studien liefern. So beobachteten einige Forschungsgruppen, dass gesättigte freie Fettsäuren im Gegensatz zu einfach ungesättigten freien Fettsäuren im endoplasmatischen Retikulum Stress verursachen sowie die c-Jun N-terminale Kinase vermittelte Apoptose über einen p53 hochregulierter Apoptosemodulator auslösen können. Bei einfach ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure und Palmitoleinsäure wurde dieser Effekt jedoch bisher noch nicht beobachtet^{159–162}.

6.4.2 Olivenöl als Fettbasis

Olivenöl ist ein wesentlicher Bestandteil der mediterranen Diät. Laut der „Seven Countries Study“¹⁶³, soll das Konzept dieser Diät, basierend auf dem typischen Ernährungsverhalten der Bewohner der Insel Kreta sowie des restlichen Griechenlands und Süditaliens in den frühen 1960er Jahren, verantwortlich für die robuste Gesundheit und hohe Lebenserwartung in dieser Region sein. Die mediterrane Diät zeichnet sich durch eine Reichhaltigkeit an pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Gemüse, Brot sowie anderen Formen von Cerealien, Kartoffeln, Nüssen, Hülsenfrüchten und Früchten als tägliches Dessert aus. Eine zentrale Rolle nimmt, wie bereits erwähnt, Olivenöl als wichtigste Fettquelle ein. Milchprodukte, Fisch und Geflügel werden in niedriger bis moderater Menge konsumiert. Eier und rotes Fleisch nehmen eher eine Nebenrolle ein. Insgesamt enthält diese Art der Ernährung eine maximale Menge von sieben bis acht Energieprozent an gesättigten Fettsäuren bei einer Gesamtfettmenge von 25 bis 35 Energieprozent, abhängig der jeweiligen Region^{164,165}. In der „Seven Countries Study“ und anderen Studien konnte gezeigt werden, dass trotz des hohen Fettgehalts das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen sowie einigen Krebsarten reduziert und auch eine Modulation der Immun- und Entzündungsantwort erreicht werden konnte^{165–169}. In der vorliegenden Studie zeugten die Ergebnisse von eindeutigen histologischen und trendweise beobachtbaren molekularen Hinweisen, welche Olivenöl protektive Effekte gegenüber der entzündlichen Komponente der NASH einräumen. Hingegen konnte keine Verbesserung der Steatose beobachtet werden. Diese Erkenntnisse lieferten bereits Studien, in denen Ratten mit Diäten mit einer unzureichenden Menge von Methionin-Cholin gefüttert wurden¹⁷⁰.

6.4.2.1 Wirkung von Olivenöl auf den Metabolismus

Olivenöl ist reich an einfach ungesättigten Fettsäuren (vgl. Tabelle 38). Aus diesem Grund liegt der Verdacht nahe, dass auf Olivenöl basierende Diäten möglicherweise weniger negative Einflüsse auf den Metabolismus ausüben als Diäten auf Kakaobutter- (SFA), Schmalz- (SFA/MUFA) oder Kokosfettbasis (SFA). Dieser Glaube beruht vor allem auf Kohortenstudien, die einen positiven Effekt der mediterranen Diät auf die kardiovaskuläre Morbidität sowie allgemeine Mortalität nachweisen^{27,171}. Eine dieser Studien ist die multizentrische KANWU Studie. Dieses Experiment mit 162 gesunden, menschlichen Teilnehmern konnte nachweisen, dass ein Ernährungswechsel von SFA zu MUFA unter isoenergetischen Bedingungen die Insulinsensitivität signifikant verbesserte, solange der Fettanteil der Kalorienaufnahme unter 37% lag. Für Personen mit einem hohen Fettgenuss, also über 37 Energieprozent, zeigten sich jedoch keine Verbesserungen. Zudem konnte auch keine Auswirkung auf die Insulinsekretion nachgewiesen werden¹⁷². Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Studie nicht überein. Die Tiere aus der

Versuchsgruppe mit der Olivenöldiät wiesen laborchemisch die Zeichen der Insulinresistenz auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der Original AD, die auf Kakaobutter und Schweineschmalz basiert, zeigten sich erhöhte Nüchtern-Glukosespiegel sowie signifikant höhere Insulinspiegel im Blut. Daraus resultierend ergab der HOMA-Index einen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten Wert von $9,05 \pm 3,04$. Dieses Ergebnis war eindeutig als diabetische Stoffwechsellage zu deuten. Die gemessenen Adiponektinspiegel im Plasma waren gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt. Auch dieser Befund ist mit einer Insulinresistenz vereinbar. Bereits andere Untersucher konnten in Tiermodellen mit Hochfettdiäten auf Olivenölbasis Insulinresistenz sowie erhöhte Plasmalipidspiegel nachweisen^{27,130,173,174}. Büttner et al. untersuchten in einem Tiermodell die metabolischen und molekularen Wirkungen verschiedener Fettquellen. Hierzu erhielten männliche Wistar-Ratten über zwölf Wochen Hochfettdiäten auf einem Energieniveau von 42% mit unterschiedlichen Fettquellen, namentlich Schweineschmalz, Olivenöl, Kokosfett und Fischöl. Es wurden das Gewicht, der Futterverbrauch, die Ganzkörper-Insulintoleranz, Plasmaparameter des Glukose- und Lipidmechanismus gemessen sowie die Leberhistologie und die hepatische Genexpression bestimmt. Hierbei präsentierten sich sowohl die Tiere der Olivenöl- als auch der Schmalzgruppe mit ausgeprägter Adipositas inklusive einer Insulinresistenz. Indes wiesen die Tiere der Kokosfett- und Fischölgruppe beinahe normale Insulinsensitivität auf. Histologisch zeigten sich in den Schmalz-, Olivenöl- und Kokosfettgruppen Zeichen der Steatose ohne größere Entzündungsreaktion. Daraus resultierend erzielten nur die Tiere in den Diäten mit Schmalz und Olivenöl, bestehend aus langkettigen SFAs und MUFAs, die klassischen Effekte von Hochfettdiäten sowie hepatische Steatose und SREBP1 Aktivierung, was die Forschungsgruppe als intakte hepatische Transkriptionseffekte von Insulin trotz metabolischer Insulinresistenz bewertete²⁷. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die bestehende These von Büttner et. al., dass der spezifische Effekt von diätetischem Olivenöl auf den Glukose- und Lipidmetabolismus als unschlüssig und äußert fragwürdig zu beurteilen ist²⁷. Zwar zeigen manche ältere Experimente mit Hochfettdiäten auf Olivenölbasis positive Effekte auf die Blutzuckerkontrolle und Insulinresistenz^{175,176}, jedoch führen Büttner et al.²⁷ diese auf die von Samaha et al. beschriebenen allgemein günstigen kurzfristigen Effekte von kohlenhydratarmen, fettreichen Diäten auf das Körpergewicht und den Glukosemetabolismus zurück^{27,177}. Obwohl bei Studien mit der klassischen mediterranen Diät eine verbesserte Insulinsensitivität beobachtet wurde¹⁷⁸, muss bedacht werden, dass diese Diätform traditionell sehr fettarm ist²⁷. Analog zeigt sich die Einschränkung bei der Gültigkeit der positiven Effekte auf den Glukosemetabolismus in der KANWU Studie¹⁷² ab einem Anteil von 37 Energieprozent. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen in Anbetracht des derzeitigen Forschungsstandes die Vermutung von Büttner et al., dass die Wirkung von großen Mengen an Ölsäure auf den menschlichen Metabolismus noch

zweifelhaft ist. Im Tierversuch führte der beschriebene Konsum eindeutig zu Adipositas und Insulinresistenz²⁷.

Tabelle 38^x

Auflistung der in Olivenöl enthaltenen Fettsäuren nach dem Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive Pomace Oil des internationalen Olivenölrates (Madrid) von 1998

Fettsäure	Olivenöl
6:0	NN ^{xi}
8:0	NN
10:0	NN
12:0	NN
14:0	NN - 0,05
16:0	7,5 - 20,0
16:1	0,3 - 3,5
17:0	NN - 0,3
17:1	NN - 0,3
18:0	0,5 - 5,0
18:1	55,0 - 83,0
18:2	3,5 - 21,0
18:3	NN - 1,0
20:0	NN - 0,6
20:1	NN - 0,4
20:2	NN
22:0	NN - 0,2
22:1	NN
22:2	NN
24:0	NN - 0,2
24:1	NN

6.4.2.2 Einfluss von Olivenöl auf die Inflammationsreaktion der NASH

Bisher konnten in Tierstudien mit Ratten und Kaninchen, denen über einen längeren Zeitraum atherogene Diäten als Futter angeboten wurde, positive Effekte von diätetischem Olivenöl auf mikrosomale Lipidperoxidation und auf das hepatische Antioxidantiensystem beobachtet werden^{179,180}. Nakbi et al. (2010) gelang es in einem Modell mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure - einem weltweit verbreiteten Herbizid - behandelten Ratten nachzuweisen, dass „Natives Olivenöl Extra“ und dessen Extrakte einen protektiven Effekt gegen oxidative Leberschäden besitzen. Hierbei beobachtete die Forschungsgruppe eine Hemmung der exzessiven Lipidperoxidation. Dadurch bessert sich die MUFA Komposition deutlich bei gleichbleibender Aktivität der Markerenzyme im Serum sowie der hepatischen Antioxidantien. Als wirkungsvoller Anteil wurde der hydrophilen Fraktion des Olivenöls eine direkte antioxidative Wirkung auf Leberzellen zugesprochen¹⁶⁹. Jedoch untersuchten diese

^x Quelle: Auszug von „Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle“ der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft, Author: Hans-Jochen Fiebig, Münster, <http://www.dgfett.de/material/fszus.htm>

^{xi} NN= Nicht nachweisbar, definiert als ≤ 0,05%

Studien nicht den Einfluss von Olivenöl auf die hepatische Entzündungsreaktion. Kasdallah et al. zeigten in ihrer Studie, dass sowohl Lipidperoxidation als auch Gewebeschäden durch chronische Ethanolexposition signifikant abnahmen, als die Versuchstiere Futter mit „Natives Olivenöl Extra“ erhielten, ein kaltgepresstes und ohne übermäßige Temperatureinwirkung aus der ersten Pressung schonend hergestelltes Olivenöl mit einem Säurebestandteil von weniger als 0,8%¹⁸¹. Somit gelang es der Forschungsgruppe nachzuweisen, dass die protektiven Effekte von Olivenöl bis zu einem bestimmten Grad unabhängig von den vorliegenden Noxen des Leberschadens sind. Des Weiteren gelang es kürzlich mittels Zellkulturstudien nachzuweisen, dass Ölsäure, der Hauptbestandteil von Olivenöl, im Vergleich zu der am häufigsten in Pflanzen vorkommenden SFA, Palmitinsäure, zwar vermehrt zu Steatose führt, aber weniger Apoptose in den Hepatozyten vermittelt¹⁸². Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung konnten weitere Zellkulturversuche liefern. So zeigten Hepatozyten und andere Zellreihen unter Behandlung mit Ölsäure oder mit erhöhter SCD1 Expression eine Neigung zur Triglyzeriddeposition, welche mit niedrigerer Toxizität verbunden ist. Auch diese Beobachtung könnte eine Ursache für die reduzierte Entzündungsreaktion unter einer Olivenöldiät sein. Schließlich konnte die vorliegende Studie ebenfalls Hinweise auf die positiven Effekte von Olivenöl auf die Entzündungsreaktion der NASH beobachten. So zeigte die Diätvariante mit Olivenöl im histologischen Scoring eine deutlich reduzierte Inflammation des Lebergewebes bei jedoch gleichbleibend ausgeprägter Steatose. Eine noch geringere Entzündung zeigte sich nur noch in den Gruppen ohne Cholesterol und Cholat. Diese beiden Nahrungsbestandteile erscheinen, wie bereits erwähnt, als die Hauptursache für die starke Entzündungsantwort zu agieren.

6.4.2.3 Diätetisches Olivenöl führt zu abgemilderter hepatischer Inflammation ohne Besserung von Insulinresistenz und Steatose

Folgend aus den Beobachtungen der vorliegenden Studie und in Anbetracht des Forschungsstandes liegt die Vermutung nahe, dass diätetisches Olivenöl keine positiven Einflüsse auf die Insulinresistenz sowie Steatose besitzt. Jedoch konnte in einigen Studien durchaus das Potential von Olivenöl, sowohl die hepatische Lipidperoxidation als auch das Antioxidationssystem der Leber positiv zu beeinflussen, nachgewiesen werden. Dies führt zu neuen therapeutischen Möglichkeiten bei der Behandlung von NASH Patienten mit starker Entzündung. Allerdings sollte der tatsächliche Nutzen im Menschen weitergehend erforscht werden. Indes kann aber nicht ausgeschlossen werden, ob nicht indirekte Effekte des Olivenöls auf den Cholesterolstoffwechsel zu diesen positiven Beobachtungen beitragen. Diesen Zweifel unterstützen Studien, in denen einfach ungesättigte Fettsäuren die hepatische Cholesterolakkumulation senken und dessen biliäre Ausscheidung fördern^{183,184}.

6.5 Insulinresistenz und Hypoadiponektämie führen nicht unbedingt zu hepatischer Inflammation

In unserer Studie zeigten sich weder signifikante histologische noch molekulare Veränderungen aufgrund eines Cholinmangels. Ratten mit einem Cholatmangel hingegen wiesen eine verminderte hepatische Entzündung und eine reduzierte Kollagensynthese auf. Ferner erzielten wir durch das Entfernen des Cholatanteils aus cholesterolreichen Diäten erniedrigte intrazelluläre Cholesterolverwerte, vergleichbar mit den Ergebnissen der Forschungsgruppe um S. Mawatari¹⁸⁵. Diese Veränderungen traten jedoch überraschenderweise nur in Anwesenheit eines deutlich erhöhten Absolutgehalts der Lebertriglyzeride auf. Diese Beobachtung spricht gegen die bisher vertretene Meinung, die hepatisches Fett als Ursache für den Entzündungsprozess per se hält. Indes fiel auf, dass die Versuchsgruppe mit dem geringsten histologischen Entzündungsindex, die Gruppe mit der Olivenöldiät, gleichzeitig die niedrigsten Adiponektin- sowie die höchsten Insulinspiegel im Plasma zusammen mit einem erhöhten Triglyzeridgehalt aufwies. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Ferramosca et al., welche eine Dissoziation von Frühzeichen des metabolischen Syndroms mit der hepatischen Inflammation entdeckten¹⁸⁶. Daraus folgend kann die These formuliert werden, dass Insulinresistenz sowie Hypoadiponektämie nicht einheitlich eine sich schnell entwickelnde hepatische Entzündung zur Folge haben müssen. Der Einfluss der einzelnen diätetischen Fettkomponenten scheint entscheidender zu sein als der des gesamten metabolischen Profils.

6.6 Resümee und Ausblick

6.6.1 Resümee

Die proinflammatorische AD geht nicht mit einer Insulinresistenz und einer grobtropfigen Steatosis aufgrund einer erhöhten hepatischer Triglyzerideinlagerung einher; somit bildet sie die humane NASH nicht komplett ab. Obwohl ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit somit nicht erreicht werden konnte, zeigen die gewonnen Forschungsergebnisse die Einzigartigkeit des Tiermodells der Variationen der atherogenen Diät nach Paigen auf. Durch die Variation der verschiedenen Fettkomponenten der Diäten konnten mit dieser Studie die unterschiedlichen Schritte der Pathogenese der nicht alkoholischen Steatohepatitis erforscht werden, ohne die allgemein üblichen unphysiologischen, unausgewogenen Hochfett- oder Hochfructosedieten. Anhand unserer Ergebnisse zeigt sich, dass der Cholatanteil der AD am stärksten für die diätetische Steatose verantwortlich ist. Mit der Modifikation des Neutralfettanteils bei einem unveränderten Anteil von etwa 15 Gewichtsprozenten konnten wir keine relevanten Veränderungen auf das Ausmaß der Triglyzeriddeposition in der Leber erzielen.

An der deutlichen hepatischen Inflammation ist vor allem der Cholesterinanteil der atherogenen Diät beteiligt, aber es gibt auch leichte Anzeichen für den begünstigenden Einfluss des Cholatanteil in der korrespondierenden Versuchsgruppe. Im Tierversuch der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Wechsel der Neutralfettkomponente zu Olivenöl am besten das Ausmaß der Hepatitis und Fibrose reduziert werden. Der Einsatz von Kokosfett konnte stattdessen ähnliche, wenn auch deutliche schwächere Effekte erzielen. Erstaunlicherweise war die Entzündung unabhängig vom Grad der Steatose. Zusammenfassend zeigten die Beobachtungen der vorliegenden Studien, dass sich Variationen der atherogenen Diät nach Paigen nicht als kompletter Modellversuch zur Abbildung einer menschlichen NASH eignen. Sie sind jedoch ein hervorragendes und einzigartiges Werkzeug zur Erforschung der einzelnen Schritte der Pathogenese der NASH, die nach wie vor noch nicht komplett verstanden ist.

6.6.2 Ausblick

Der eindeutige Vorteil der präsentierten Arbeit liegt im physiologischen Design der Studie. Die eingesetzten Versuchstiere, männliche Wistar-Ratten, wurden nicht genetisch manipuliert, um den Phänotyp des metabolischen Syndroms beziehungsweise einer NASH zu zeigen. Des Weiteren erhielten die Tiere freien Zugang zu Diäten, die keine unausgewogene Ernährung lieferten sowie frischem Wasser, das nicht mit Fructose oder anderen hochkalorischen Stoffen versetzt worden war. Dennoch gibt es angesichts der Beobachtungen und der Auswertung der Forschungsdaten noch Möglichkeiten zur Veränderung, die in späteren Studien berücksichtigt werden könnten.

Obwohl die histologischen und molekularen Befunde bereits nach einer relativ kurzen Haltungszeit von acht Wochen auftraten, könnte eine Verlängerung des Haltungs- bzw. Fütterungszeitraums zur Intensivierung der durch die Diäten verursachten Effekte beitragen. Die Pathogenese der NASH im Menschen ist ebenso ein schleichender Prozess. Deshalb würde sich eine Verlängerung der Tierhaltung auf zwölf Wochen als vernünftige Alternative anbieten, um so gegebenenfalls statistisch relevantere Ergebnisse zu erzielen.

In diesem Tiermodell präsentieren sich die Diäten mit einem Gesamtfettanteil zwischen 15,9% und 17,1%. Dadurch unterscheiden sich die Futterregimes nicht wesentlich vom prozentualen Fettanteil der verwendeten Kontrolle. Mit einem größeren Fettanteil könnten in einem geeigneten Tiermodell auch stärker die Aspekte des metabolischen Syndroms zum Ausdruck kommen. Bereits im Anschluss an das Experiment der vorliegenden Studie sind weitere Modellversuche geplant, die den Einfluss der Fettkomponente auf die NASH untersuchen sollen. In diesen Experimenten wird jedoch die Fettbasis von 17% auf 25% beziehungsweise 35% erhöht.

Möglicherweise gelingt es einem Ansatz mit einer fettreicheren Diät und längerer Haltungsdauer ein deutlicheres Abbild des metabolischen Syndroms inklusive einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis im Tierversuch zu erzeugen. Es sollten aber in weiteren Untersuchungen nicht die physiologischen Grenzen überschritten werden.

7. Zusammenfassung

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis ist weltweit die häufigste Lebererkrankung, zudem wird sie aktuell als Bestandteil des metabolischen Syndroms verstanden. Das vorherrschende histologische Bild, entspricht einer ausgeprägten hepatozytären Verfettung mit portaler Inflammation und Fibrose. Obwohl bisher die pathogenetischen Zusammenhänge zwischen Steatose und der Entzündungsreaktion noch weitestgehend unklar sind, halten aktuelle Studien eine Beziehung zwischen der Fettsäurenkomposition der Diät und einer hepatischen Inflammation beziehungsweise Fibroseentwicklung beim Menschen für sehr wahrscheinlich. Ausgehend von dieser Annahme entwickelte diese Studie ein Tiermodell der NASH, in dem durch die Gabe der atherogenen Diät nach Paigen beziehungsweise einer ihrer Variationen der Einfluss unterschiedlicher Fette und Fettanteile auf metabolische Parameter und die Inflamationsreaktion untersucht werden sollte.

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten gewählt, die für acht Wochen ad libitum ausschließlich mit je einer Variation der AD gefüttert wurden. In der Ursprungsform beinhaltet diese Diätkomposition neben einem erhöhten Neutralfettanteil (etwa 15 Gewichtsprozent, 18:0 und 18:1 Fettsäuren im Verhältnis 1:1,7) als mögliche inflammatorische Komponenten Cholat (0,5 Gewichtsprozent) und Cholesterin (1,25 Gewichtsprozent). Um den hepatotoxischen Effekten eines Cholinmangels vorzubeugen, wurden 0,125 Gewichtsprozent Cholinchlorid hinzugefügt. Der Ansatz dieser Studie beinhaltete zwei Teilexperimente. Zum einen wurde die Neutralfettkomponente durch Olivenöl (18:1) beziehungsweise Kokosöl (12:0 bis 14:0) ersetzt, zum anderen wurden die Cholat-, Cholesterin- und Cholinzusätze aus der Diätkomposition entfernt. Als Kontrolle dienten Tiere unter dem Ernährungsregime einer Standard-Nagerdiät beziehungsweise der originalen atherogenen Diät nach Paigen.

Nach der achtwöchigen Diätphase wurden die Tiere getötet, um Blut sowie Leberanteile für die weitere Analytik entnehmen zu können. Hierbei wurden mit Hilfe von ELISA-Assays beziehungsweise enzymatisch Plasmaglukose, -triglyzeride, -insulin, -leptin, -adiponektin und die hepatische Triglyzerideinlagerung quantifiziert. Zudem führte ein unabhängiger und verblindeter Untersucher ein histopathologisches Scoring unter den Gesichtspunkten der Inflammation sowie der Steatose durch. Ferner wurden die mRNA-Expressionen von Kollagen Typ Ia1 und TNF- α im Lebergewebe mittels LightCycler® PCR als Marker für Fibrose beziehungsweise Entzündung analysiert.

Keines der Fütterungsregimes führten jedoch zu signifikanten Unterschieden im Gewicht, Nüchtern-Blutzucker, Plasma-Leptin oder in den Plasmatriglyzeriden im Vergleich zur Original AD. Die Gruppe AD mit Olivenöl erreichte die größten Insulinspiegel und HOMA-Indizes, welche als Anzeichen der Insulinresistenz zu werten sind. Im Vergleich zur Standard-Nagerdiät wies alle AD Variationen eine stärkere Steatose auf, am ausgeprägtesten jedoch die Gruppe ohne diätetischen Cholatzusatz.

Histologisch präsentierte sich die Original AD Gruppe durchgehend mit einer ausgeprägten, kleintropfigen Verfettung und einer deutlichen Inflamationsreaktion. Wie erwartet zeigten die Diätvarianten ohne Cholesterin und ohne Cholatzusatz jeweils eine deutliche Reduktion dieser histologischen Gesichtspunkte. Die Variationen der Neutralfettkomponente mit Olivenöl und Kokosfett erzielte eine vergleichbare Steatose wie Original AD, jedoch eine deutlich reduzierte Inflammation. Besonders imponierte diese Beobachtung in der Versuchsgruppe, welche die AD mit Olivenöl als Futter erhielt. Die Ergebnisse der Analysen mRNA-Expression von Kollagen Typ Ia1- und TNF α korrelierten mit der Beurteilung der Leberschnitte im histopathologischen Scoring. So gab diese Messung Hinweise auf eine Reduktion der Fibrogenese und der Inflammation in den Diätgruppen ohne Cholesterin- oder Cholatzusatz sowie in den Gruppen mit Olivenöl beziehungsweise Kokosfett als Neutralfettkomponente.

In Rahmen dieser Studie gelang es der Forschungsgruppe nicht, das Gesamtbild der humanen NASH abzubilden. Keines der Fütterungsregimes konnte sowohl Insulinresistenz, als auch eine grobtropfige Steatosis aufgrund einer erhöhten hepatischen Triglyzerideinlagerung in den Versuchstieren hervorrufen. Aus den Ergebnissen dieses Experiments lässt sich jedoch ableiten, dass vor allem der Cholatanteil der AD für die Induktion der Steatose im Tiermodell verantwortlich ist. Dagegen konnten die Variationen der Fettsäurekomposition durch den Wechsel der Neutralfettkomponente bei konstanten 15 Gewichtsprozent anscheinend keine Auswirkung auf die hepatische Triglyzeridakkumulation herbeiführen. In den Versuchen dieser Studie war die hepatische Inflammation hauptsächlich auf den Cholesterinanteil der AD zurückzuführen. Ein Ersatz der langkettigen gesättigten Fettsäuren in der Original AD, basierend auf Kakaobutter sowie Schweineschmalz als Neutralfettkomponente durch Ölsäure, hatte günstige Effekte auf das Ausmaß der hepatischen Entzündung und Fibrogenese. Schließlich zeigte sich, dass die Entzündungsreaktion unabhängig vom Grad der Steatose in den Versuchsgruppen dieser Studie war.

Die Beobachtungen und Ergebnisse dieser Studie unterstützen die These, dass sich Variationen der atherogenen Diät nach Paigen als einzigartiges Instrument zur Erforschung der verschiedenen Schritte der Pathogenese der Steatohepatitis eignen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass auf ein bisher in der Forschung übliches unphysiologisches und unausgewogenes Hochfett-Regime verzichtet werden konnte.

8. Dank

An dieser Stelle bedanke ich mich beim Klinikum der Universität Regensburg, insbesondere bei der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I für die freundliche Unterstützung dieser Dissertation.

Ich danke herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Roland Büttner, Chefarzt der Inneren Medizin der Klinik Bogen für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit sowie für die Inspiration zu dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Iris Bettermann sowie Christine Hechtel für die freundliche Zusammenarbeit, Unterstützung und geduldige Anleitung zu den zahlreichen Laborversuchen im Forschungsgebäude H4 der Universitätsklinik Regensburg.

Vielen Dank an die bischöfliche Begabtenförderung *Cusanuswerk* für die Unterstützung meines Studiums und dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester Anita, meiner Tante Elisabeth, meinen Großeltern, Sepp und Beate Ellwanger und meiner Partnerin Claudia für die Unterstützung und Motivation während meiner gesamten Studienzeit bedanken sowie bei all meinen Freundinnen und Freunden, die mich während meines Studiums begleitet haben.

9. Literaturverzeichnis

1. Bohn, J. Kochbücher der 50er Jahre. Vom Nachkriegsmangel zum Wirtschaftswunder-Überfluss. <http://www.wirtschaftswundermuseum.de/> (2011).at
<<http://www.wirtschaftswundermuseum.de/>>
2. Bundesministerium für Ernährung - Landwirtschaft und Verbraucherschutz Nationale Verzehrsstudie II. www.was-esse-ich.de at <www.was-esse-ich.de>
3. Bergmann, K.E. & Mensink, G.B. [Anthropometric data and obesity]. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* **61 Spec No**, S115-20 (1999).
4. Reaven, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-607 (1988).
5. Grundy, S.M., Brewer, H.B., Cleeman, J.I., Smith, S.C. & Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* **109**, 433-8 (2004).
6. National Education Programm Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143-421 (2002).
7. Wikipedia.org Metabolisches Syndrom. (2011).at
<http://de.wikipedia.org/wiki/Metabolisches_Syndrom>
8. Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **15**, 539-53 (1998).
9. Einhorn, D. et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **9**, 237-52
10. International Diabetes Federation *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. (2006).at
<http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf>
11. Wirth, A. Die negativen Auswirkungen des Wohlstands in den Griff bekommen. *CME Compact* 5-16 (2006).
12. Green, R.M. NASH--hepatic metabolism and not simply the metabolic syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **38**, 14-7 (2003).
13. Brunt, E.M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Seminars in liver disease* **21**, 3-16 (2001).
14. Caldwell, S.H. et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* **31**, 430-4 (1999).

15. Kuczmarski, R.J., Carroll, M.D., Flegal, K.M. & Troiano, R.P. Varying body mass index cutoff points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). *Obesity research* **5**, 542-8 (1997).
16. Tilg, H. & Hotamisligil, G.S. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* **131**, 934-45 (2006).
17. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine* **346**, 1221-31 (2002).
18. Adams, L.A., Angulo, P. & Lindor, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **172**, 899-905 (2005).
19. Browning, J.D. & Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of clinical investigation* **114**, 147-52 (2004).
20. Flegal, K.M., Ogden, C.L., Wei, R., Kuczmarski, R.L. & Johnson, C.L. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. *The American journal of clinical nutrition* **73**, 1086-93 (2001).
21. Rashid, M. & Roberts, E.A. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **30**, 48-53 (2000).
22. Targher, G. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* **54**, 3541-6 (2005).
23. McCullough, A.J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease* **8**, 521-33, viii (2004).
24. Marchesini, G. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* **50**, 1844-50 (2001).
25. Marchesini, G. *et al.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **37**, 917-23 (2003).
26. Marchesini, G., Marzocchi, R., Agostini, F. & Bugianesi, E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology* **16**, 421-7 (2005).
27. Buettner, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology* **36**, 485-501 (2006).
28. Brunt, E.M. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in liver disease* **24**, 3-20 (2004).
29. den Boer, M., Voshol, P.J., Kuipers, F., Havekes, L.M. & Romijn, J.A. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 644-9 (2004).
30. Wouters, K. *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **48**, 474-86 (2008).

-
31. Parekh, S. & Anania, F.A. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **132**, 2191-207 (2007).
 32. Safwat, G.M. *et al.* Induction of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance by feeding a high-fat diet in rats: does coenzyme Q monomethyl ether have a modulatory effect? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **25**, 1157-68 (2009).
 33. Svegliati-Baroni, G. *et al.* A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *The American journal of pathology* **169**, 846-60 (2006).
 34. Adams, L.A. & Angulo, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **22**, 1129-33 (2005).
 35. Kuntz, E. & Kuntz, H.-D. *Hepatology Textbook and Atlas. History, Morphology, Biochemistry, Diagnostics, Clinic, Therapy*. 595-604 (Springer Berlin Heidelberg (Springer-11650 /Dig. Serial)): Berlin, Heidelberg, 2008).
 36. Eriksson, S., Eriksson, K.F. & Bondesson, L. Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta medica Scandinavica* **220**, 83-8 (1986).
 37. James, O. & Day, C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* **353**, 1634-6 (1999).
 38. Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Clemens, M. & Diehl, A.M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2557-62 (1997).
 39. Zamin, I., de Mattos, A.A. & Zettler, C.G. Nonalcoholic steatohepatitis in nondiabetic obese patients. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* **16**, 303-7 (2002).
 40. Kuntz, E. Fatty liver - a morphological and clinical review. *Med. Welt* **50**, 406-413 (1999).
 41. Mofrad, P. *et al.* Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **37**, 1286-92 (2003).
 42. Zafrani, E.S. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **444**, 3-12 (2004).
 43. Denk, H., Stumptner, C., Fuchsbichler, A. & Zatloukal, K. [Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Histopathologic and pathogenetic considerations]. *Der Pathologe* **22**, 388-98 (2001).
 44. Thaler, H. Die Fettleber und ihre pathogenetische Beziehung zur Lebercirrhose. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* **335**, 180-210 (1962).

45. Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B. & Oh, B.J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **55**, 434-8 (1980).
46. Teli, M.R., James, O.F., Burt, A.D., Bennett, M.K. & Day, C.P. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **22**, 1714-9 (1995).
47. Day, C.P. & James, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**, 842-5 (1998).
48. Pérez-Carreras, M. *et al.* Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **38**, 999-1007 (2003).
49. Neuschwander-Tetri, B.A., Brunt, E.M., Wehmeier, K.R., Oliver, D. & Bacon, B.R. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **38**, 1008-17 (2003).
50. Angulo, P., Keach, J.C., Batts, K.P. & Lindor, K.D. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **30**, 1356-62 (1999).
51. Clark, J.M. & Diehl, A.M. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **289**, 3000-4 (2003).
52. Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A. & Bacon, B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology* **94**, 2467-74 (1999).
53. George, D.K. *et al.* Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* **114**, 311-8 (1998).
54. Itoh, S., Yougel, T. & Kawagoe, K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. *The American journal of gastroenterology* **82**, 650-4 (1987).
55. Molleston, J.P., White, F., Teckman, J. & Fitzgerald, J.F. Obese children with steatohepatitis can develop cirrhosis in childhood. *The American journal of gastroenterology* **97**, 2460-2 (2002).
56. Powell, E.E. *et al.* The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **11**, 74-80 (1990).
57. Shimada, M., Hashimoto, E., Kaneda, H., Noguchi, S. & Hayashi, N. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors for liver fibrosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **24**, 429-438 (2002).
58. Sorbi, D., Boynton, J. & Lindor, K.D. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *The American journal of gastroenterology* **94**, 1018-22 (1999).

-
59. Goland, S. *et al.* Cardiac abnormalities as a new manifestation of nonalcoholic fatty liver disease: echocardiographic and tissue Doppler imaging assessment. *Journal of clinical gastroenterology* **40**, 949-55 (2006).
 60. Chitturi, S. *et al.* Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology (Baltimore, Md.)* **36**, 403-9 (2002).
 61. Saibara, T. "Insufficient" leptin production for the fat mass: a risk factor for nonalcoholic steatohepatitis in obese patients? *Journal of gastroenterology* **38**, 522-3 (2003).
 62. Sumida, Y. *et al.* Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* **38**, 32-8 (2003).
 63. DERITIS, F., GIUSTI, G., PICCININO, F. & CACCIATORE, L. BIOCHEMICAL LABORATORY TESTS IN VIRAL HEPATITIS AND OTHER HEPATIC DISEASES. EVALUATION AND FOLLOW-UP. *Bulletin of the World Health Organization* **32**, 59-72 (1965).
 64. DocCheck Flexikon De-Ritis-Quotient. <http://flexikon.doccheck.com> (2011).at <<http://flexikon.doccheck.com/De-Ritis-Quotient>>
 65. Burt, A.D., Mutton, A. & Day, C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in diagnostic pathology* **15**, 246-58 (1998).
 66. Jepsen, P. *et al.* Prognosis of patients with a diagnosis of fatty liver--a registry-based cohort study. *Hepato-gastroenterology* **50**, 2101-4 (2003).
 67. Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1111-9 (2005).
 68. Katsuki, A. *et al.* Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes care* **26**, 2341-4 (2003).
 69. Nehra, V., Angulo, P., Buchman, A.L. & Lindor, K.D. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive diseases and sciences* **46**, 2347-52 (2001).
 70. Feldstein, A.E. *et al.* Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **40**, 185-94 (2004).
 71. Akerman, P. *et al.* Antibodies to tumor necrosis factor- α inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *The American journal of physiology* **263**, G579-85 (1992).
 72. Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J. & Fausto, N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1441-6 (1997).
 73. Crespo, J. *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **34**, 1158-63 (2001).

-
74. Feldstein, A.E. *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **125**, 437-43 (2003).
 75. Ribeiro, P.S. *et al.* Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *The American journal of gastroenterology* **99**, 1708-17 (2004).
 76. Hotamisligil, G.S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **24 Suppl 4**, S23-7 (2000).
 77. Valenti, L. *et al.* Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **122**, 274-80 (2002).
 78. Li, Z. *et al.* Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **37**, 343-50 (2003).
 79. Yin, M. *et al.* Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* **117**, 942-52 (1999).
 80. Lin, H.Z. *et al.* Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nature medicine* **6**, 998-1003 (2000).
 81. Solomon, S.S., Mishra, S.K., Cwik, C., Rajanna, B. & Postlethwaite, A.E. Pioglitazone and metformin reverse insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in liver cells. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **29**, 379-82 (1997).
 82. Tomita, K. *et al.* Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through up-regulation of c-Met. *Gastroenterology* **126**, 873-85 (2004).
 83. Ohata, M. *et al.* Pioglitazone prevents acute liver injury induced by ethanol and lipopolysaccharide through the suppression of tumor necrosis factor-alpha. *Alcoholism, clinical and experimental research* **28**, 139S-144S (2004).
 84. Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W. & Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **389**, 610-4 (1997).
 85. Ferrannini, E., Haffner, S.M., Mitchell, B.D. & Stern, M.P. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* **34**, 416-22 (1991).
 86. Marchesini, G. & Forlani, G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **35**, 497-9 (2002).
 87. Bugianesi, E., Marzocchi, R., Villanova, N. & Marchesini, G. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): treatment. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **18**, 1105-16 (2004).
 88. Koteish, A. & Diehl, A.M. Animal models of steatosis. *Seminars in liver disease* **21**, 89-104 (2001).

-
89. Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Schriemer, R. & Robertson, G.R. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *Journal of hepatology* **37**, 206-13 (2002).
 90. Ip, E. *et al.* Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **38**, 123-32 (2003).
 91. Hui, J.M. *et al.* Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology (Baltimore, Md.)* **40**, 46-54 (2004).
 92. Arita, Y. *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* **257**, 79-83 (1999).
 93. Hotta, K. *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**, 1595-9 (2000).
 94. Kubota, N. *et al.* Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 25863-6 (2002).
 95. Kumada, M. *et al.* Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 85-9 (2003).
 96. Maeda, N. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature medicine* **8**, 731-7 (2002).
 97. Yamauchi, T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762-9 (2003).
 98. Hug, C. *et al.* T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10308-13 (2004).
 99. Kumada, M. *et al.* Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* **109**, 2046-9 (2004).
 100. Wulster-Radcliffe, M.C., Ajuwon, K.M., Wang, J., Christian, J.A. & Spurlock, M.E. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 924-9 (2004).
 101. Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. & Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **323**, 630-5 (2004).
 102. Bugianesi, E. *et al.* Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**, 3498-504 (2005).
 103. Musso, G. *et al.* Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology* **100**, 2438-46 (2005).

-
104. Xu, A. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *The Journal of clinical investigation* **112**, 91-100 (2003).
 105. Kamada, Y. *et al.* Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* **125**, 1796-807 (2003).
 106. Ford, E.S., Giles, W.H. & Dietz, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **287**, 356-9 (2002).
 107. Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L.C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **15**, 798-808 (2007).
 108. Tilg, H. & Diehl, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *The New England journal of medicine* **343**, 1467-76 (2000).
 109. Sanyal, A.J. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* **2**, 46-53 (2005).
 110. Pelleymounter, M.A. *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science (New York, N.Y.)* **269**, 540-3 (1995).
 111. MASEK, J. & FABRY, P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* **15**, 444-5 (1959).
 112. PECKHAM, S.C., ENTENMAN, C. & CARROLL, H.W. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *The Journal of nutrition* **77**, 187-97 (1962).
 113. Youngren, J.F., Paik, J. & Barnard, R.J. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **91**, 2240-7 (2001).
 114. Schrauwen, P. & Hesselink, M.K.C. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 1412-7 (2004).
 115. Tepperman, H.M., Dewitt, J. & Tepperman, J. Effect of a high fat diet on rat adipocyte lipolysis: responses to epinephrine, forskolin, methylisobutylxanthine, dibutyryl cyclic AMP, insulin and nicotinic acid. *The Journal of nutrition* **116**, 1984-91 (1986).
 116. Moraes, R.C. *et al.* Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* **144**, 4773-82 (2003).
 117. Lavau, M., Fried, S.K., Susini, C. & Freychet, P. Mechanism of insulin resistance in adipocytes of rats fed a high-fat diet. *Journal of lipid research* **20**, 8-16 (1979).
 118. Maegawa, H., Kobayashi, M., Ishibashi, O., Takata, Y. & Shigeta, Y. Effect of diet change on insulin action: difference between muscles and adipocytes. *The American journal of physiology* **251**, E616-23 (1986).

119. Storlien, L.H., James, D.E., Burleigh, K.M., Chisholm, D.J. & Kraegen, E.W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *The American journal of physiology* **251**, E576-83 (1986).
120. Bollheimer, L.C., Skelly, R.H., Chester, M.W., McGarry, J.D. & Rhodes, C.J. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *The Journal of clinical investigation* **101**, 1094-101 (1998).
121. Bollheimer, L.C. *et al.* Insulin-sparing effects of troglitazone in rat pancreatic islets. *Journal of molecular endocrinology* **31**, 61-9 (2003).
122. Unger, R.H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* **44**, 863-70 (1995).
123. Winzell, M.S. *et al.* Pancreatic beta-cell lipotoxicity induced by overexpression of hormone-sensitive lipase. *Diabetes* **52**, 2057-65 (2003).
124. Yaqoob, P. *et al.* Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *The international journal of biochemistry & cell biology* **27**, 297-310 (1995).
125. Haque, M. & Sanyal, A.J. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **16**, 709-31 (2002).
126. Ishigaki, Y. *et al.* Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* **54**, 322-32 (2005).
127. Oakes, N.D., Cooney, G.J., Camilleri, S., Chisholm, D.J. & Kraegen, E.W. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* **46**, 1768-74 (1997).
128. Lingohr, M.K., Buettner, R. & Rhodes, C.J. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in molecular medicine* **8**, 375-84 (2002).
129. Ahrén, B. *et al.* Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas* **18**, 75-83 (1999).
130. Storlien, L.H. *et al.* Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 280-9 (1991).
131. Storlien, L.H. *et al.* Dietary fats and insulin action. *Diabetologia* **39**, 621-31 (1996).
132. Paigen, B., Morrow, A., Brandon, C., Mitchell, D., & Holmes, P. (1985). Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* **57(1)**, 65-73.
133. B-Bridge International, I. (Mountain V. *Mouse/Rat Adiponectin ELISA Kit – User Manual*.

134. Mercodia AB (Uppsala) *Mercodia Rat Insulin ELISA – Enzym immunoassay – Directions for Use*. (Mercodia AB (Uppsala): 2008).
135. Mediagnost (Reutlingen) *m/rLeptin-ELISA Kit E06 d. Booklet*. (Mediagnost (Reutlingen): 2008).
136. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) *cobas® TG Triglycerides GPO-PAP*. (Roche Diagnostics GmbH (Mannheim):).
137. Qiagen N.V. (Venlo) *RNeasy® Mini Handbook. 4th Edition*. (Qiagen N.V. (Venlo): 2006).
138. Promega Corporation (Madison) *Technical Bulletin: Reverse Transcription System – Instructions for use of product A3500*. (Promega Corporation (Madison):).
139. Qiagen N.V. (Venlo) *MinElute® Handbook*. (Qiagen N.V. (Venlo): 2006).
140. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) *LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I*. (Roche Diagnostics GmbH (Mannheim):).
141. Larter, C.Z. Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important. *Journal of gastroenterology and hepatology* **22**, 1353-4 (2007).
142. Xu, Z.-J., Fan, J.-G., Ding, X.-D., Qiao, L. & Wang, G.-L. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Digestive diseases and sciences* **55**, 931-40 (2010).
143. Liao, F., Andalibi, A., DeBeer, F.C., Fogelman, A.M. & Lusis, A.J. Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *The Journal of clinical investigation* **91**, 2572-9 (1993).
144. Matsuzawa, N. *et al.* Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **46**, 1392-403 (2007).
145. Dorn, C. *et al.* Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of clinical and experimental pathology* **3**, 505-14 (2010).
146. Musso, G. *et al.* Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **37**, 909-16 (2003).
147. Puri, P. *et al.* A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **46**, 1081-90 (2007).
148. Caballero, F. *et al.* Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *Journal of hepatology* **50**, 789-96 (2009).
149. Malhi, H. & Gores, G.J. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in liver disease* **28**, 360-9 (2008).

-
150. Vinaixa, M. *et al.* Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *Journal of proteome research* **9**, 2527-38 (2010).
 151. Biegls, V. *et al.* Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *Gastroenterology* **138**, 2477-86, 2486.e1-3 (2010).
 152. Mari, M. *et al.* Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism* **4**, 185-98 (2006).
 153. Nelson, A., Torres, D.M., Morgan, A.E., Fincke, C. & Harrison, S.A. A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *Journal of clinical gastroenterology* **43**, 990-4 (2009).
 154. Basciano, H. *et al.* Metabolic effects of dietary cholesterol in an animal model of insulin resistance and hepatic steatosis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **297**, E462-73 (2009).
 155. Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M. & Unger, R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2498-502 (1998).
 156. Karaskov, E. *et al.* Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* **147**, 3398-407 (2006).
 157. Kong, J.Y. & Rabkin, S.W. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. *Biochimica et biophysica acta* **1485**, 45-55 (2000).
 158. Chai, W. & Liu, Z. p38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor-kappaB degradation in human coronary artery endothelial cells. *Endocrinology* **148**, 1622-8 (2007).
 159. Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W. & Gores, G.J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* **281**, 12093-101 (2006).
 160. Wei, Y., Wang, D. & Pagliassotti, M.J. Saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in liver cells. *Molecular and cellular biochemistry* **303**, 105-13 (2007).
 161. Cazanave, S.C. *et al.* JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of biological chemistry* **284**, 26591-602 (2009).
 162. Akazawa, Y. *et al.* Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of hepatology* **52**, 586-93 (2010).
 163. Keys, A. & Aravnis, C. *Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease*. (Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England: 1980).

-
164. Willett, W.C. *et al.* Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition* **61**, 1402S-1406S (1995).
165. Hu, F.B. The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *The New England journal of medicine* **348**, 2595-6 (2003).
166. Visioli, F. & Galli, C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical reviews in food science and nutrition* **42**, 209-21 (2002).
167. Keys, A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *The American journal of clinical nutrition* **61**, 1321S-1323S (1995).
168. Stark, A.H. & Madar, Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition reviews* **60**, 170-6 (2002).
169. Nakbi, A. *et al.* Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition & metabolism* **7**, 80 (2010).
170. Hussein, O. *et al.* Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World journal of gastroenterology : WJG* **13**, 361-8 (2007).
171. Kris-Etherton, P.M. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation* **100**, 1253-8 (1999).
172. Vessby, B. *et al.* Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* **44**, 312-9 (2001).
173. Del Moral, M.L. *et al.* High-fat sunflower and olive oil diets affect serum lipid levels in steatotic rat liver differently. *Journal of nutritional science and vitaminology* **43**, 155-60 (1997).
174. Tsunoda, N. *et al.* High-monounsaturated fat diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism: clinical and experimental* **47**, 724-30 (1998).
175. Parillo, M. *et al.* A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental* **41**, 1373-8 (1992).
176. Campbell, L.V., Marmot, P.E., Dyer, J.A., Borkman, M. & Storlien, L.H. The high-monounsaturated fat diet as a practical alternative for NIDDM. *Diabetes care* **17**, 177-82 (1994).
177. Samaha, F.F. *et al.* A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *The New England journal of medicine* **348**, 2074-81 (2003).
178. Esposito, K. *et al.* Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **292**, 1440-6 (2004).

-
179. Aguilera, C.M., Mesa, M.D., Ramírez-Tortosa, M.C., Quiles, J.L. & Gil, A. Virgin olive and fish oils enhance the hepatic antioxidant defence system in atherosclerotic rabbits. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* **22**, 379-84 (2003).
 180. Perona, J.S., Arcemis, C., Ruiz-Gutierrez, V. & Catalá, A. Effect of dietary high-oleic-acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 730-5 (2005).
 181. Kasdallah-Grissa, A. *et al.* Dietary virgin olive oil protects against lipid peroxidation and improves antioxidant status in the liver of rats chronically exposed to ethanol. *Nutrition research (New York, N.Y.)* **28**, 472-9 (2008).
 182. Ricchi, M. *et al.* Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology* **24**, 830-40 (2009).
 183. Li, Y. *et al.* Dietary fatty acids regulate cholesterol induction of liver CYP7alpha1 expression and bile acid production. *Lipids* **40**, 455-62 (2005).
 184. Lambert, M.S., Avella, M.A., Botham, K.M. & Mayes, P.A. The type of dietary fat alters the hepatic uptake and biliary excretion of cholesterol from chylomicron remnants. *The British journal of nutrition* **83**, 431-8 (2000).
 185. Mawatari, S. *et al.* High-cholesterol diets induce changes in lipid composition of rat erythrocyte membrane including decrease in cholesterol, increase in alpha-tocopherol and changes in fatty acids of phospholipids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**, 1457-64 (2003).
 186. Ferramosca, A., Savy, V. & Zara, V. Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 62-9 (2008).